



Caractérisation des interactions protéine-ligand par échange 1H/3H : Application au complexe entre la protéine hAsf1 et l'histone H3.

Guillaum Mousseau

► To cite this version:

Guillaum Mousseau. Caractérisation des interactions protéine-ligand par échange 1H/3H : Application au complexe entre la protéine hAsf1 et l'histone H3.. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00364269

HAL Id: tel-00364269

<https://theses.hal.science/tel-00364269>

Submitted on 25 Feb 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ORSAY
N° D'ORDRE : 8658

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Guillaume Mousseau

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
Discipline : Chimie

Caractérisation des interactions protéine–ligand par échange $^1\text{H}/^3\text{H}$:
Application au complexe entre la protéine hAsf1 et l'histone H3

Soutenue le 11 Mai 2007 devant la commission d'examen :

Mme Mélanie Spothem-Maurizot
M. Eric Forest
M. Jean-Pierre Mahy
M. Bernard Rousseau
M. Jean-Christophe Cintrat

Rapporteur
Rapporteur
Président de Jury
Directeur de thèse
Examineur

Sommaire

Introduction générale.....	1
I Détection et caractérisation des interactions protéine–protéine.....	3
I.A Identification à haut débit des interactions protéine–protéine	6
I.A.1 Méthodes d’affinité couplées à la spectrométrie de masse.....	6
I.A.2 Le double hybride.....	11
I.A.3 Les systèmes de complémentation par fragments de protéine.....	13
I.A.4 Autres méthodes à haut débit	17
I.B Caractérisation structurale des interactions protéine–protéine	23
I.B.1 Caractérisation de structures de complexes protéiques	24
I.B.2 Caractérisation d’interface protéique	34
I.B.3 La Modélisation Moléculaire	48
II Détection et quantification des sites d’attaque des radicaux hydroxyle sur les protéines	53
II.A Les origines de la méthode	57
II.A.1 Historique des méthodes de détection de radicaux par marquage au tritium	57
II.A.2 Echange $^1\text{H}/^2\text{H}$ en présence de HO^\bullet et d’un donneur de ^2H	59
II.B Principe de notre méthode de détection et de quantification de radicaux.....	61
II.B.1 Principe	61
II.B.2 Production des radicaux hydroxyle : HO^\bullet	62
II.B.3 Les agents de réparation donneurs de tritium.....	65
II.C Les résultats préliminaires du laboratoire.....	66
II.D Amélioration et optimisation de la méthode.....	72
II.E Echelle relative de réactivité des acides aminés	73
II.E.1 Détermination de la dose nécessaire pour une incorporation de tritium satisfaisante	73
II.E.2 Etude de la réactivité des acides aminés.....	75
II.F Détection et quantification des radicaux sur des peptides	87
II.F.1 Essais de marquage sur des peptides	87
III Application à la caractérisation de l’interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et un fragment de l’histone H3.....	95
III.A Méthode de caractérisation des interactions protéine–protéine	97
III.B La protéine Asf1.....	98
III.B.1 Le nucléosome.....	99

III.B.2	Rôles de la protéine Asf1.....	101
III.B.3	L'histone H3.....	108
III.B.4	La structure du complexe Asf1-H3/H4.....	111
III.C	Caractérisation des acides aminés de H3₁₂₂₋₁₃₅ en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆.....	116
III.C.1	Mise au point des conditions expérimentales.....	116
III.C.2	Caractérisation des acides aminés de H3 ₁₂₂₋₁₃₅ impliqués dans l'interaction avec hAsf1 ₁₋₁₅₆	118
III.D	Premiers essais sur la protéine hAsf1.....	123
III.E	Conclusions.....	127
Conclusion générale.....		131
IV Matériels et méthodes.....		135
IV.A	Préparation des composés.....	137
IV.A.1	Matériels commerciaux.....	137
IV.A.2	Expression et Purification de la protéine hAsf1 ₁₋₁₅₆	137
IV.A.3	Préparation de l'apomyoglobine.....	140
IV.A.4	La préparation du donneur de ³ H (³ H-BPASS).....	141
IV.B	Production de radicaux hydroxyle.....	143
IV.B.1	Deux sources de HO [•] : le LINAC ou l'autoradiolyse de l'eau tritiée.....	143
IV.B.2	Calibration de la dose générée avec le LINAC : Dosage de Fricke.....	145
IV.B.3	Descriptif du canon à électron (LINAC).....	146
IV.B.4	Schéma de la jaquette de protection.....	148
IV.B.5	Procédure d'irradiation d'échantillons tritiés avec le LINAC.....	149
IV.C	Le séquenceur d'Edman.....	150
IV.C.1	Le Principe.....	150
IV.C.2	Descriptif du matériel.....	153
IV.D	Le compteur de scintillation liquide.....	153
IV.E	Purification des échantillons par HPLC.....	154
IV.F	Scintillation liquide et mesure de la radioactivité par HPLC.....	155
IV.G	Protocole d'identification des radicaux sur les acides aminés.....	155
IV.H	Protocole général de mesure de l'activité spécifique des PTH-acides aminés.....	159
IV.I	Protocole d'identification des radicaux sur les peptides.....	161
IV.I.1	Protocole utilisant l'autoradiolyse de l'eau tritiée comme source d'HO [•]	161
IV.I.2	Protocole utilisant le LINAC comme source d'HO [•]	164
IV.J	Protocole d'identification des radicaux sur le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ et sur Asf1₁₋₁₅₆.....	167
IV.J.1	Protocole de marquage du peptide H3 ₁₂₂₋₁₃₅	167

IV.J.2	Protocole de marquage de la protéine hAsf1 ₁₋₁₅₆	170
	Bibliographie	175
V	<i>Annexe</i>	191
V.A	Mise au point de l'analyse sur le séquenceur.....	193
V.B	Mise au point des conditions des expériences menées sur les peptides avec le LINAC. 196	
V.C	Etude des peptides en mélange après autoradiolyse de l'eau tritiée.....	204
V.D	Interaction H3 ₁₂₂₋₁₃₅ avec hAsf1 ₁₋₁₅₆	204
V.D.1	Interaction hAsf1 ₁₋₁₅₆ avec H3 ₁₂₂₋₁₃₅	208
V.E	Dichroïsme circulaire de l'apomyoglobine après irradiation avec le LINAC	214

Introduction générale

Depuis que le génome humain a été caractérisé, un nouveau défi est de mieux comprendre l'organisation et les fonctions des réseaux d'interaction entre protéines qui sont impliqués dans la grande majorité des fonctions cellulaires. Les interactions protéine-protéine jouent ainsi un rôle essentiel dans le fonctionnement de la cellule en régulant la croissance, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. De nombreux complexes sont impliqués dans des phénomènes aussi variés que la transduction du signal, l'assemblage macromoléculaire, la régulation et le contrôle de la réplication de l'ADN, la transcription de l'ARN et la traduction des protéines. Essentiellement toutes les fonctions cellulaires impliquent des interactions protéine-protéine. De plus, l'altération d'interactions protéiques est connue pour être impliquée dans le développement de diverses maladies telles que des cancers, des désordres neurodégénératifs et des maladies infectieuses. Ainsi, la compréhension globale au niveau des réseaux d'interactions et détaillée au niveau des complexes permettra de mieux cerner les différents mécanismes qui régulent la vie cellulaire.

L'un des grands enjeux actuels est donc de réaliser une cartographie complète des interactomes des divers organismes vivants et notamment de l'homme. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses méthodes et variantes sont apparues afin d'identifier les interactions protéiques. Certaines d'entre elles sont capables de réaliser des cartes d'interaction protéine-protéine à grande échelle, avec notamment des techniques telles que le double hybride et des techniques de purifications associées à la spectrométrie de masse.

L'identification est une première étape importante. Mais, l'autre enjeu est de comprendre, à un niveau moléculaire et atomique, comment les différentes protéines d'un complexe interagissent entre elles. La connaissance détaillée des structures et des mécanismes pourra sans doute permettre dans l'avenir de développer notamment des médicaments ciblant ces interactions. La cristallographie par diffraction de rayons X et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) sont les deux grandes techniques qui permettent de réaliser des structures des complexes protéiques. Cependant, des méthodes moins gourmandes en temps et en

quantités de protéines sont apparues tel le « footprinting » qui caractérise uniquement les surfaces des protéines et leurs zones d'interaction à une moindre résolution.

Dans le premier chapitre seront exposées les principales méthodes actuelles d'identification à haut débit des interactions protéine–protéine. Puis les méthodes permettant de caractériser les surfaces d'interaction ou de déterminer les structures des complexes seront répertoriées en discutant les principaux avantages et inconvénients.

Notre approche de caractérisation des zones d'interaction protéine–protéine est une méthode de « footprinting »¹, basée sur l'identification et la quantification de radicaux formés sur les résidus des protéines accessibles à l'eau. Le deuxième chapitre discutera ainsi du développement de cette méthode d'identification radicalaire utilisant l'atome de tritium comme étiquette radioactive. Notre approche sera enfin validée dans un troisième chapitre en l'appliquant à la caractérisation des acides aminés impliqués dans l'interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et un fragment de l'histone H3.

¹ Par la suite, nous emploierons le terme anglais de « footprinting ». Ce terme désigne une méthode consistant à prendre une empreinte de la zone d'interaction, identifiée en comparant la macromolécule seule ou en présence d'un partenaire.

I Détection et caractérisation des interactions protéine–protéine

De nombreuses approches biochimiques, biophysiques, génétiques et informatiques ont été développées pour détecter et analyser les interactions protéine–protéine. Selon la méthode utilisée, différents types d'informations peuvent être obtenus. Ces multiples méthodes sont employées dans le but d'identifier les protéines partenaires, de mesurer qualitativement ou quantitativement les interactions protéiques *in vitro* ou *in vivo*, de visualiser ces interactions dans les compartiments cellulaires, ou de caractériser les interfaces d'interaction entre protéines [1, 2].

Ainsi, différentes techniques d'électrophorèse sont utilisées pour identifier les interactions protéine–protéine, comme le gel retard d'électrophorèse avec détection par fluorescence et le « Blot overlay», une méthode basée sur le principe du Western Blot [3, 4]. Des techniques d'affinité sont aussi utilisées comme le GST-pull-down, la co-immunoprécipitation et la purification d'affinité en tandem, suivies d'une identification par électrophorèse en deux dimensions ou par une séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) [5-8]. La méthode de double hybride, ainsi que les systèmes de complémentation par fragments de protéines sont couramment utilisés pour la détection à haut débit des interactions protéine–protéine *in vivo* [9-12]. Des méthodes génétiques de type « Synthetic-lethality » peuvent également permettre de détecter à haut débit les interactions entre deux produits de gènes, mais plus globalement décrivent les interactions génétiques en apportant des informations fonctionnelles [13-16]. De plus, des algorithmes sont développés pour reconnaître dans la séquence primaire d'une protéine des motifs de séquences ou de domaines caractéristiques d'un type d'interaction [17, 18].

La visualisation et la quantification en temps réel des interactions protéine–protéine dans les cellules vivantes peuvent être réalisées par des techniques de fluorescence (FRET) ou de bioluminescence (BRET) [19-22].

Il existe aussi toute une série de méthodes *in vitro* qui apportent des informations telles que la stoechiométrie du complexe, l'état d'oligomérisation ou des données thermodynamiques ou cinétiques. Le dichroïsme circulaire, habituellement employé pour déterminer la structure secondaire des protéines en solution, est utilisé pour suivre les changements de conformation lorsque deux protéines interagissent ensemble [23]. Cette technique quantitative permet d'estimer les constantes d'affinité du complexe étudié. Une

autre technique, la calorimétrie par titration isothermale, permet de déterminer directement les paramètres thermodynamiques de la réaction d'association de deux protéines en solution [24]. La résonance plasmonique de surface permet quant à elle l'étude des interactions protéine–protéine en temps réel et détermine les constantes de vitesse d'association, d'équilibre et de dissociation en suivant la fixation d'une protéine en solution sur une protéine cible immobilisée [25]. La polarisation de fluorescence permet également d'obtenir une valeur précise de la constante de dissociation à l'équilibre (K_d) [4, 26]. Une autre méthode, l'électrophorèse capillaire d'immunoaffinité permet à la fois de déterminer à haut débit des constantes d'association, des constantes de vitesse et la stoechiométrie du complexe étudié [27, 28].

La stoechiométrie d'un complexe peut également être déterminée en associant la technique de diffusion d'un faisceau laser multi-angles avec la chromatographie d'exclusion et la réfractométrie interférométrique [29]. L'ultracentrifugation analytique et la chromatographie de filtration sur gel sont utilisées indépendamment pour déterminer l'état d'oligomérisation du système et obtenir des constantes d'association [30-32].

Ainsi, de nombreuses méthodes sont utilisées pour caractériser d'une manière ou d'une autre les interactions protéine–protéine [1, 2]. Dans un souci de clarté, nous avons choisi de développer uniquement les principales approches permettant de réaliser expérimentalement l'identification des interactions physiques entre protéines à l'échelle du génome, telles que les méthodes d'affinité couplées à la spectrométrie de masse et le double hybride. La seconde partie de ce chapitre traite des principales méthodes permettant de caractériser les interfaces protéiques et les structures de complexes.

I.A Identification à haut débit des interactions protéine–protéine

I.A.1 Méthodes d'affinité couplées à la spectrométrie de masse.

La combinaison de méthodes de purification de protéines et de la spectrométrie de masse est une des méthodes les plus utilisées pour détecter les interactions protéiques. De manière générale, une protéine reconnaissant une étiquette ou un épitope est fixée sur un support solide. Un lysat cellulaire est élué sur ce support et les protéines spécifiques s'y accrochent

[5]. Généralement, les protéines isolées par purification sont séparées par gel SDS-PAGE, digérées par une enzyme puis analysées par MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption – Time-Of-Flight) ou par LC-ESI-MS (Liquid Chromatography / Electrospray Ionization / Mass Spectrometry). Les listes de masses des peptides observés permettent de remonter aux protéines impliquées en comparant avec des bases de données. De la LC-MS-MS peut aussi être faite pour identifier le peptide et donc la protéine [33, 34]. La spectrométrie de masse est une méthode de choix car elle permet rapidement de détecter des centaines voire des milliers de protéines en un jour à des concentrations inférieures au picomolaire.

a. La co-immunoprécipitation

Une des façons les plus classiques consiste à isoler les complexes protéiques formés *in vivo*, en réalisant une co-immunoprécipitation avec un anticorps (monoclonal ou polyclonal) reconnaissant la protéine cible (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

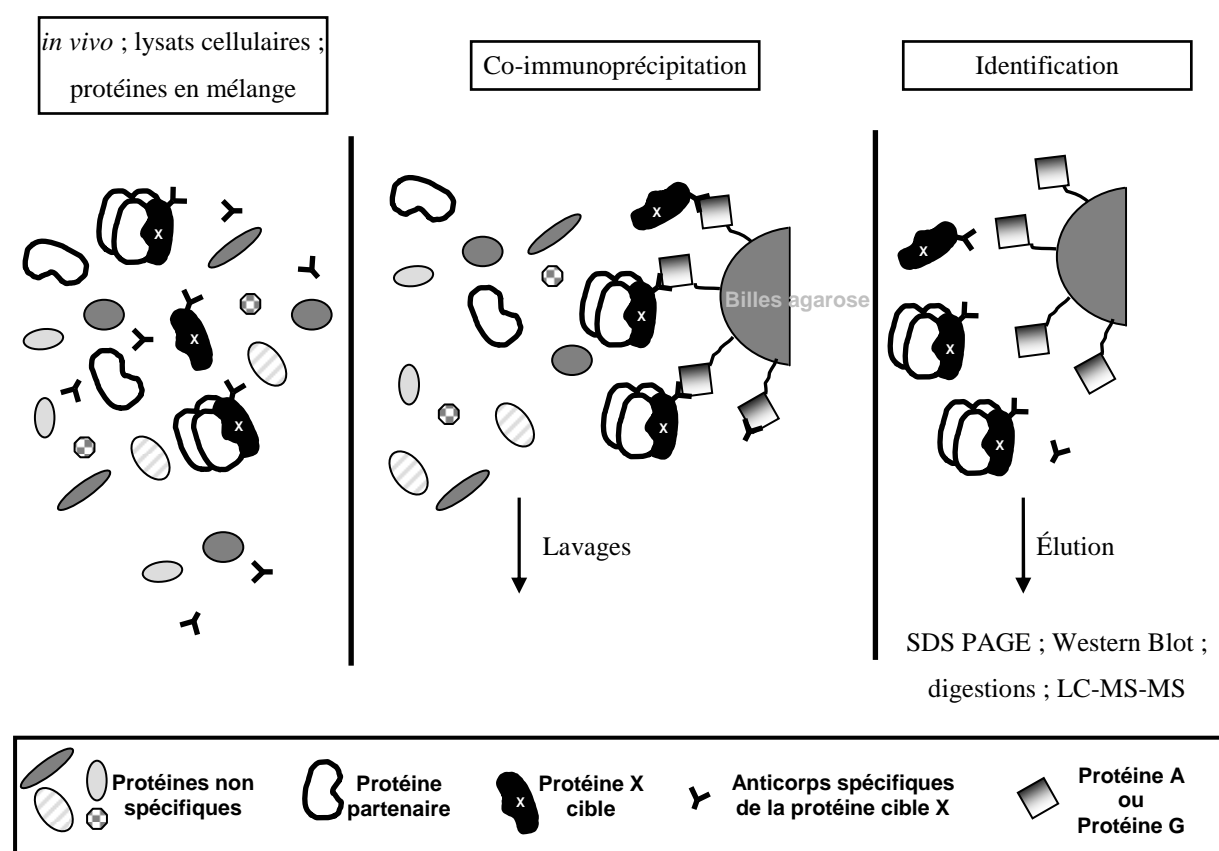


Figure I-1 Principe de la co-immunoprécipitation.

Le complexe immunitaire est alors capturé sur support solide où est fixée soit la Protéine A soit la Protéine G qui interagit avec l'anticorps. Le processus de capture du complexe en solution est appelé précipitation. Après un lavage intensif des billes d'agarose pour éliminer

les interactions non spécifiques, les protéines fixées sont éluées et les partenaires identifiées par spectrométrie de masse. Cette méthode possède l'avantage de pouvoir isoler rapidement dans des conditions physiologiques les protéines endogènes concernées et leurs partenaires associés, sans avoir besoin de recourir à des clonages ou des expressions ectopiques. Cette méthode présente plusieurs inconvénients, notamment la nécessité d'avoir un anticorps de bonne qualité pour chaque protéine testée. De plus, des faux positifs peuvent apparaître quand des protéines autres que l'immunogène réagissent avec l'anticorps immobilisé ou se fixent non spécifiquement sur la résine. Enfin, les lavages successifs pour diminuer cette dernière difficulté risquent de décrocher les protéines partenaires qui présentent de faibles affinités.

b. Purification par affinité par l'intermédiaire d'étiquettes

L'utilisation d'épitopes ou d'étiquettes (His, Flag, Myc, biotine, GST ...) permet de s'affranchir du problème de production d'anticorps spécifiques de chaque protéine. De plus, la préparation de banques de protéines présentant la même étiquette à partir d'ADN complémentaire (ADNc) est simplifiée. La purification par affinité consiste à fixer sur un support la protéine cible par l'intermédiaire de son étiquette. Par exemple, une protéine X de fusion avec la Glutathion S transférase (GST) est accrochée sur des billes d'agarose supportant du Glutathion réduit (GSH) (Figure I-2).

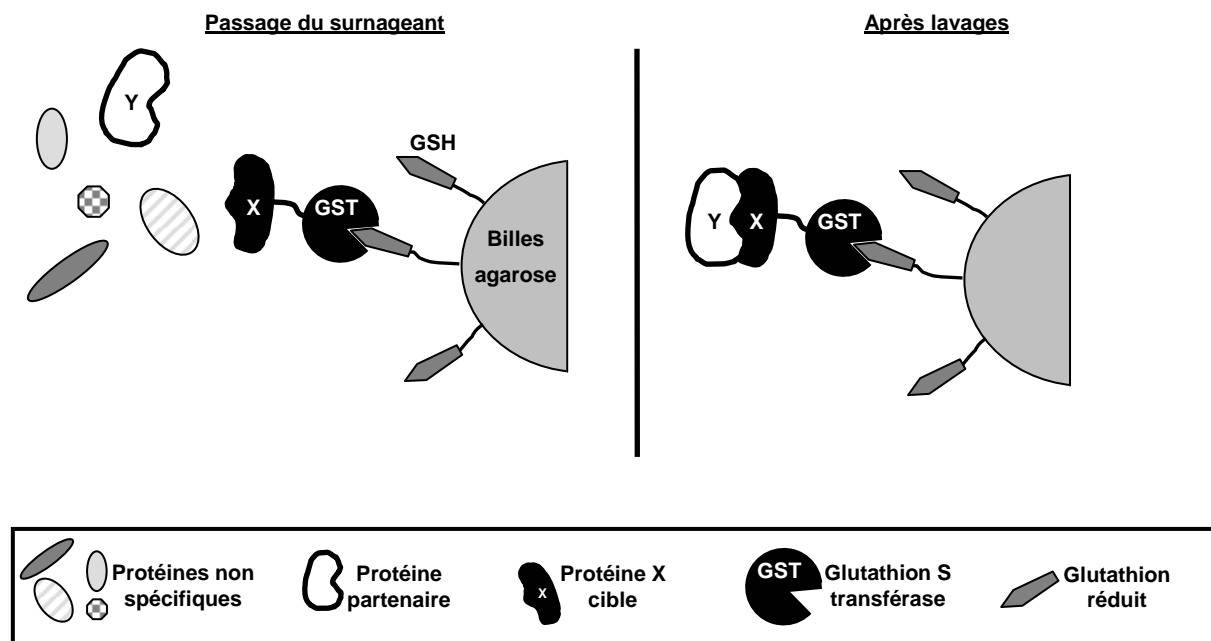


Figure I-2 Représentation schématique du principe du GST-pulldown.

Les partenaires issus par exemple d'un extrait cellulaire interagissent avec la protéine X alors que les autres sont éliminés lors de lavages. Le complexe ainsi isolé est ensuite élué avec de la GST libre puis analysé par gel SDS-PAGE et Western Blot ou par spectrométrie de masse. Ces expériences permettent d'avoir une grande reproductibilité. Par contre, ces constructions peuvent entraîner des différences d'expression de protéines les unes par rapport aux autres, ou la surexpression de protéines toxiques pour la cellule. Les étiquettes fusionnées à la protéine peuvent aussi entraîner de mauvais repliements. Cette méthode, en utilisant l'étiquette Flag, a permis de fournir en 2002 un des deux premiers exemples d'identification à l'échelle du protéome d'interaction protéine-protéine par spectrométrie de masse [6].

c. La purification par affinité en tandem (TAP-TAG)

La méthode « Tandem Affinity Purification » (TAP) est basée sur l'utilisation séquentielle de deux étiquettes [35, 36]. Une protéine de fusion possédant une Protéine A, un site de coupure à la Tev et un peptide affiné pour la calmoduline (DLC) est exprimée dans la cellule. Le complexe formé autour de cette protéine est purifié une première fois par l'intermédiaire de la Protéine A qui interagit avec l'immunoglobuline immobilisée sur billes. Après lavage puis clivage avec la protéase spécifique Tev, le complexe purifié s'accroche une deuxième fois sur des billes où la calmoduline est fixée. Cette deuxième étape permet d'éliminer la Tev et les protéines non spécifiques. L'ajout de EGTA permet ensuite de libérer le complexe protéique purifié. La détection se fait ensuite par spectrométrie de masse. Cette méthode permet de sélectionner les complexes dans des conditions quasi physiologiques, de manière hautement reproductible et comparable.

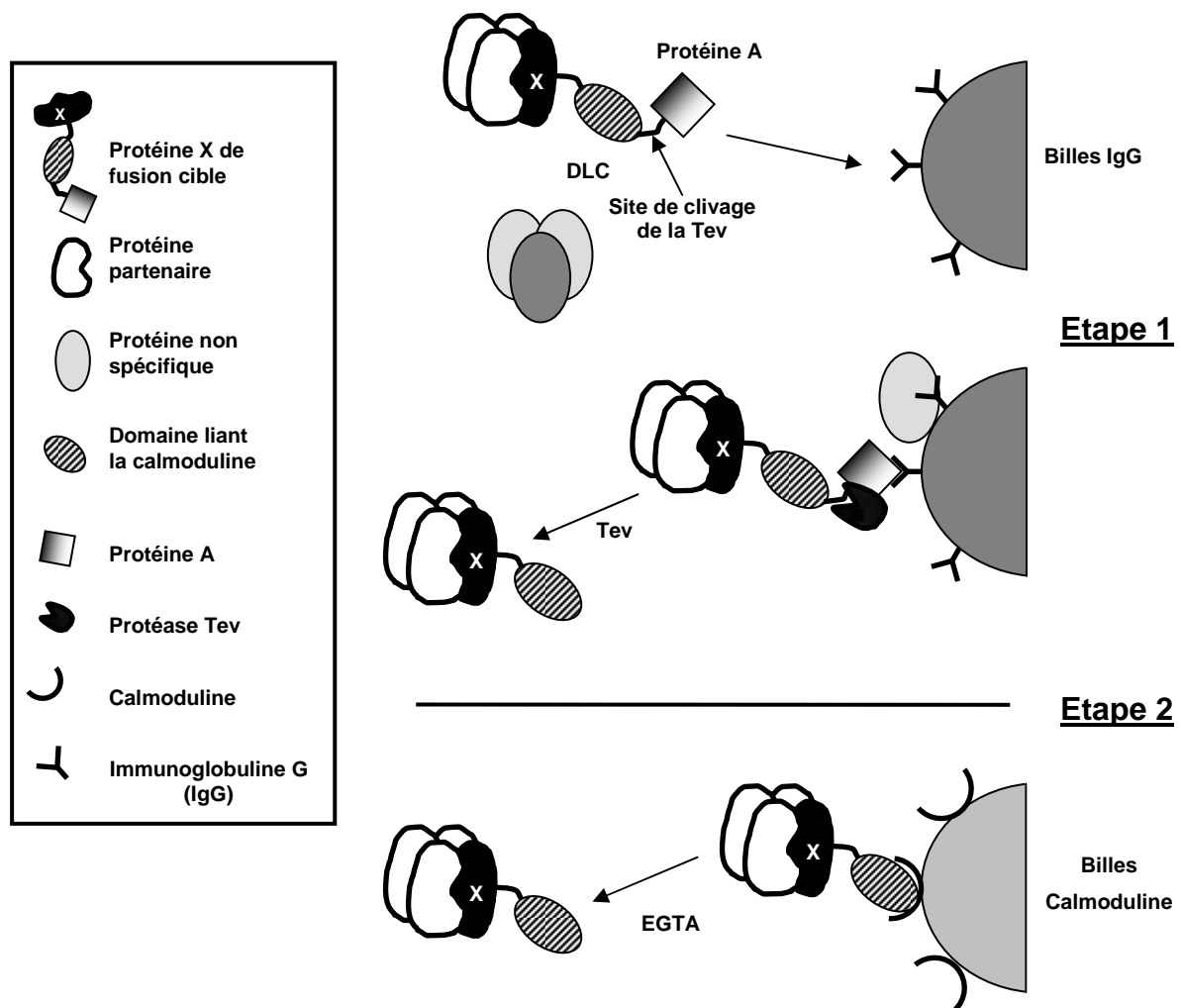


Figure I-3 Principe de la purification par affinité en tandem.

Cette méthode a été appliquée à l'étude de protéomes à haut débit comme celui de la levure *Saccharomyces cerevisiae* [7, 37, 38]. L'utilisation de cette méthode chez les eucaryotes supérieurs reste plus compliquée. Toutefois, la cartographie de 32 protéines connues ou supposées être impliquées dans le chemin de transduction du signal TNF- α /NF- κ B humain a permis de détecter 171 interactions protéine-protéine, et ce dans les conditions physiologiques et tout en conservant leurs modifications post-traductionnelles respectives [39-41]. Des séries de modifications de cette technique TAP/MS sont apparues pour notamment améliorer la possibilité d'utiliser cette méthode à haut débit chez les eucaryotes supérieurs [40, 41].

I.A.2 Le double hybride

Une autre méthode très répandue pour réaliser de l'identification à grande échelle d'interaction protéine-protéine deux à deux et *in vivo* est le « double hybride ». Cette technique a été développée par Fields et Song chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure I-4) [42].

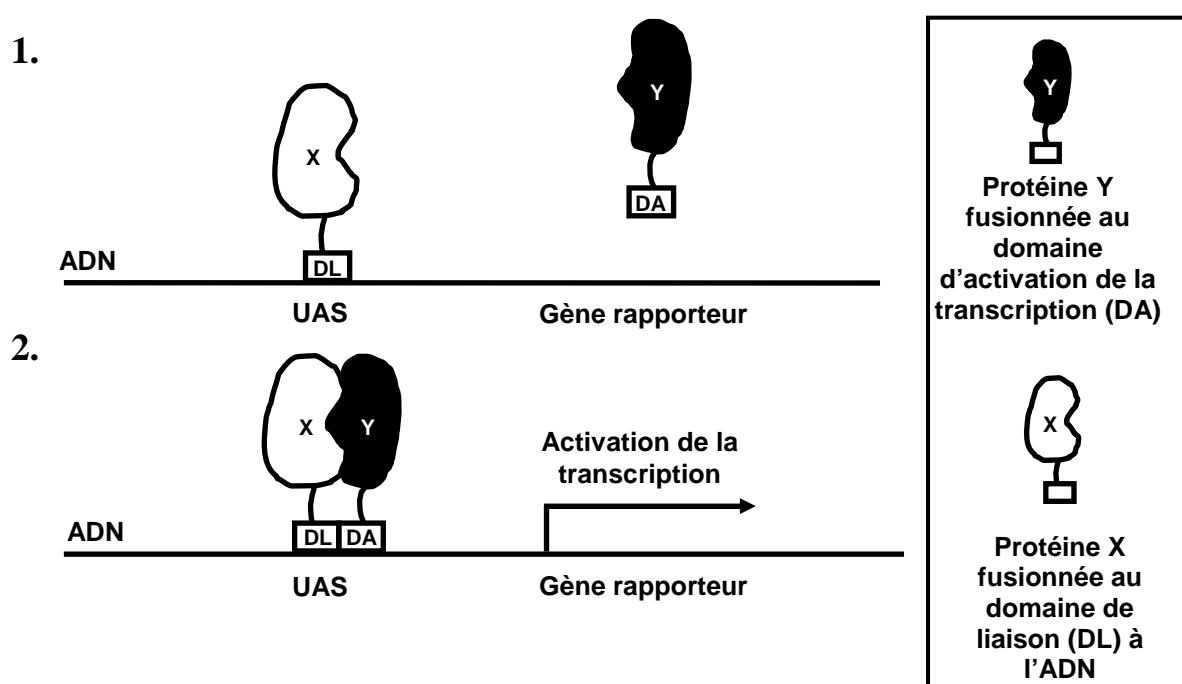


Figure I-4 Principe du double hybride.

Cette méthode originale est basée sur l'utilisation d'un activateur de la transcription Gal4 dont les domaines de liaison à l'ADN (DL) et d'activation de la transcription (DA) peuvent être dissociés. Le principe consiste à exprimer dans la levure, sous la forme de protéines hybrides, les deux protéines X et Y dont on veut tester l'interaction. La protéine de fusion DL-X est obtenue en fusionnant une protéine X au domaine N-terminal de Gal4 qui se lie de façon spécifique à la séquence d'ADN (UAS). La protéine de fusion Y-DA est obtenue quant à elle en fusionnant une protéine Y au domaine C-terminal de Gal4 qui contient la partie activatrice de la transcription. Les deux plasmides qui portent ces constructions sont introduits dans une souche de la levure *Saccharomyces cerevisiae* contenant le gène rapporteur GAL1-*lacZ* sous le contrôle de la séquence UAS où vient se fixer spécifiquement le DL. Lors de l'interaction entre la protéine Y et la protéine X, le DA se retrouve de nouveau associé au DL. Le gène rapporteur GAL1-*lacZ*, qui encode pour la β -galactosidase, est alors transcrit. Cette enzyme transforme un substrat soluble et incolore (X-gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-

thiogalactopyranoside) en un composé bleu insoluble. Cette astuce permet de sélectionner les colonies capables d'utiliser le galactose présent dans le milieu ou devenant bleues, le changement de couleur signalant la présence d'une interaction entre deux protéines. Depuis, de nombreuses études ont été menées en utilisant la stratégie du double hybride. Diverses versions améliorées ont été développées, en utilisant notamment d'autres types de gènes rapporteurs (HIS3, LEU2, ADE2, URA3,...), d'autres domaines de liaison à l'ADN (lexA, TeR,...) ou même en transposant la méthode dans d'autres systèmes (bactéries, mammifères) [43, 44].

Cette méthode permet de détecter les interactions *in vivo*. Elle est sensible, rapide, simple à mettre en œuvre et ne nécessite aucune purification préalable. Ce système permet d'étudier tous les types de protéines participant aux différents processus cellulaires, à l'exception des protéines membranaires et extracellulaires. Il permet de détecter les interactions faibles et transitoires. Enfin, avec l'apparition de nouvelles variantes de la méthode double hybride, la détection des protéines impliquées dans des interactions avec l'ADN (one-hybrid system), l'ARN (RNA-based three-hybrid system), de petits ligands (small molecule-based three-hybrid system) et des protéines ayant subi des modifications post-traductionnelles, est rendue possible (Tribid system) [45, 46].

Les systèmes « two-bait two-hybrid » et « dual bait two-hybrid » permettent de tester dans une même cellule et donc dans les mêmes conditions physiologiques, une protéine Z-DA simultanément avec deux protéines (X-DL et Y-DL) et de discriminer laquelle des deux protéines est en interaction [47-50]. La mise au point d'une version inversée du système double hybride, le « Reverse two-hybrid » permet de sélectionner cette fois-ci les souches de mutants de la protéine X qui n'interagissent plus avec la protéine Y, et ainsi de mettre en évidence l'importance de certains acides aminés pour l'interaction [46, 51, 52]. Ce système, basé sur le concept de « sélection négative » repose sur l'utilisation d'un gène rapporteur URA3 dont l'expression va être toxique pour la cellule dans des conditions de croissance spécifique. Ce gène encode pour une enzyme Ura3 qui catalyse la transformation de l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) en un composé toxique pour la cellule. L'interaction d'une protéine Y-DA avec une autre protéine X-DL mutée mais fonctionnelle va entraîner l'expression de l'enzyme Ura3 et ainsi la mort cellulaire. La présence d'une mutation perturbant plus ou moins fortement cette interaction va provoquer une diminution de l'expression du gène rapporteur et donc une survie cellulaire accrue.

La méthode double hybride possède l'énorme avantage de pouvoir être utilisée en criblage à haut débit [53]. Onze ans après l'apparition de la méthode, la première carte d'interaction à l'échelle du génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été dessinée [54]. Suite à cela, un nombre important d'interactomes a été généré pour plusieurs organismes : *Helicobacter pylori*, *Plasmodium falciparum*, *Caenorhabditis elegans*, des virus, des levures, la drosophile et très récemment l'homme [8, 9, 12, 55-61].

Le principal inconvénient de la méthode double hybride est la génération de nombreux faux positifs (interactions non spécifiques, protéines de fusion X-DL autoactivatrices), estimés à plus de 50% lors d'un criblage. De plus, toutes les interactions ne sont pas visibles, et leur détection de façon binaire ne permet pas l'identification des complexes multimériques. Du fait de la localisation nucléaire du système rapporteur, les protéines impliquées dans les interactions doivent être présentes dans le noyau avec un repliement natif. La détection des interactions impliquant les protéines membranaires est donc bien compromise. Enfin, la toxicité de certaines protéines empêche leur analyse dans ce système *in vivo*. Malgré ces inconvénients, le système double hybride reste une méthode de choix pour poser les fondations de l'étude des interactions protéine – protéine à l'échelle du protéome [45, 53].

I.A.3 Les systèmes de complémentation par fragments de protéine

L'analyse des interactions par double hybride est limitée, comme nous l'avons vu précédemment, à la détection des interactions dans le noyau. Afin d'améliorer cette méthode double hybride, des modifications ou évolutions ont été apportées. Des systèmes analogues de « complémentation par des fragments de protéines » sont basés sur l'idée de scinder en deux une protéine, généralement une enzyme, pour qu'elle perde son activité, puis de la reconstituer par l'intermédiaire de l'interaction entre deux protéines de fusion X et Y. L'interaction entre les deux morceaux de la protéine clivée doit être suffisamment faible pour qu'elle ne s'auto-réassemble pas sans X-Y. La détection des interactions peut ensuite se faire soit directement par fluorescence, par bioluminescence, par colorimétrie ou survie de la cellule, soit indirectement en passant par l'activation d'un gène rapporteur.

a. La méthode « split ubiquitin »

Une méthode basée sur l'utilisation des fragments N et C-terminaux de l'ubiquitine et d'un gène rapporteur a été développée pour l'étude des interactions impliquant des protéines membranaires [62-64] (Figure I-5). L'interaction spécifique entre les protéines X et Y permet la reconstitution des fragments N et C-terminaux de l'ubiquitine (Nub et Cub). Lors de la réassociation, les protéases spécifiques de l'ubiquitine viennent cliver et libérer l'activateur de la transcription (R) qui entre dans le noyau pour activer la transcription du gène rapporteur.

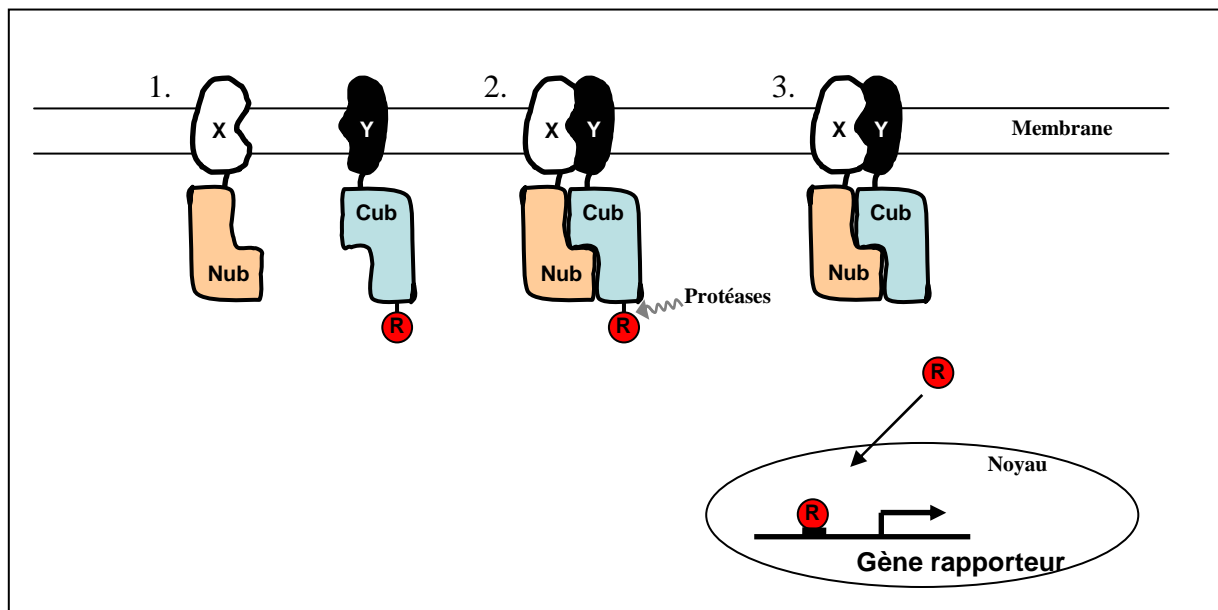


Figure I-5 Schéma de principe de la méthode « split ubiquitin ».

Cette méthode de « split-ubiquitin » présente l'avantage de détecter les interactions dans leur environnement natif, *in situ* et *in vivo* et tout comme la méthode double hybride, les interactions transitoires sont détectées [65]. Une variante utilise la survie cellulaire comme système de détection des interactions [66, 67]. Récemment, l'équipe de Frommer a criblé les partenaires éventuels solubles et membranaires des canaux à potassium d'*Arabidopsis* [68] et Fields et son laboratoire ont identifié à grande échelle des interactions impliquant des protéines membranaires intégrales [10].

b. Autres systèmes de complémentation par fragments de protéine

La méthode « split-ubiquitin » ne permet pas de détecter les interactions entre protéines du cytoplasme et protéines nucléaires. D'autres méthodes analogues sont développées dans la même période, utilisant des enzymes comme la dihydrofolate réductase (DHFR) [69], la β -

galactosidase [70], la β -lactamase [71, 72], la luciférase [73, 74] mais aussi des protéines fluorescentes (GFP, YFP, ...).

i. Le système « split-DHFR »

La méthode « split-DHFR » permet la détection des interactions par sélection sur un milieu déficient en nucléotide ou par l'intermédiaire d'un inhibiteur fluorescent spécifique qui interagit de façon stoechiométrique avec la DHFR reconstitué [69]. Ce système a permis de tester $1,72 \cdot 10^{10}$ combinaisons de polypeptides pour permettre la sélection de nouvelles paires de « leucine zipper » [75]. Toutefois, en raison de la fixation d'un seul inhibiteur fluorescent par enzyme reconstitué, ce système n'est pas basé sur l'amplification enzymatique du signal fluorescent et présente donc des problèmes de sensibilité.

ii. Le système « split-galactosidase »

La trans-complémentation de deux mutants $\Delta\alpha$ et $\Delta\omega$ de la β -galactosidase lors de l'interaction de X avec Y permet de retrouver l'activité enzymatique nécessaire pour métaboliser un substrat fluorescent [70]. Malheureusement, la taille importante de l'enzyme peut gêner stériquement l'interaction et un bruit de fond constant est observé à cause de la capacité des deux mutants $\Delta\alpha$ et $\Delta\omega$ à interagir faiblement.

iii. Le système « split-lactamase »

Un système utilisant la β -lactamase permet de contourner ces inconvénients. Elle possède un substrat fluorescent (CCF2/AM) perméable aux cellules qui permet à la méthode d'avoir une sensibilité importante et d'être détectable en quelques minutes. Cette méthode permet à la fois de détecter des interactions transitoires, mais aussi les interactions protéine-protéine inductibles par des hormones, du calcium ou même en présence de modifications post-traductionnelles. Enfin, cette méthode peut être adaptée à un criblage à haut débit de banques d'ADNc [71, 72].

iv. Le système « split-luciférase »

Une méthode de détection par bioluminescence, utilisant la luciférase, présentant une sensibilité élevée et un bruit de fond très faible, permet de détecter de façon efficace les interactions protéine-protéine avec ou sans modifications post-traductionnelles dans les cellules et les animaux [73, 74].

v. Complémentation de fragments de protéines fluorescentes

D'autres méthodes de complémentations sont basées sur l'utilisation directe de protéines fluorescentes (GFP, YFP, ...) [76]. Cette méthode permet de détecter des interactions faibles ayant un K_d de l'ordre du millimolaire [77]. Sur le même principe, des travaux ont été menés pour développer toute une gamme de protéines fluorescentes avec des caractéristiques spectrales différentes pour pouvoir visualiser simultanément plusieurs interactions dans la même cellule [78]. Cette méthode de complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC), testée sur une interaction connue entre bJun et bFos, a permis de tester et développer 12 protéines fluorescentes avec 7 classes spectrales différentes. Un exemple récent, utilisant la protéine de fluorescence YFP, a permis la détection d'interactions faibles et transitoires dans un processus biologique de sécrétion de protéines difficile à étudier avec les méthodes courantes [11]. Par simple criblage d'une banque, ce procédé est capable de détecter des interactions entre protéines cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires. De plus, ce criblage se fait *in situ* et *in vivo*, dans un environnement physiologique normal, avec des niveaux d'expression des protéines de fusion comparables à ceux des molécules endogènes. L'intensité d'émission d'un tel système permet de visualiser par microscopie de fluorescence les complexes formés dans leurs compartiments cellulaires normaux dans les cellules de mammifères vivantes. Avec l'utilisation de ces systèmes de complémentations, des criblages de banques ciblés sur une protéine donnée d'un processus biologique ont pu être réalisés [79, 80].

c. Les intéines

Une équipe japonaise se sert d'un concept faisant intervenir le phénomène de « splicing » de protéines [81]. C'est un processus autocatalytique post-traductionnel où une intéine est excisée, produisant de manière concomitante la liaison des deux extéines flanquantes. Il est à noter que le remplacement des extéines par d'autres peptides ne perturbe pas le phénomène de « splicing ». Umezawa et son équipe les ont donc remplacés par les fragments de luciférase ou de GFP pour réaliser la détection des interactions entre les protéines X et Y de fusion par le système de reconstitution des protéines [82, 83].

Bien qu'ils permettent d'identifier les interactions entre protéines membranaires et cytoplasmiques, les systèmes basés sur la reconstitution ou sur la complémentation de rapporteur clivé présentent un signal plus faible que celui provenant d'une protéine rapporteur intacte. La dernière avancée de la méthode évite ce problème en utilisant un domaine de liaison à l'ADN (DL) et un activateur de transcription (DA) entier [81]. Le DL est modifié

pour l'empêcher de localiser seul dans le noyau, et le DA n'est actif que lorsqu'il est lié au DL. Ces deux molécules sont attachées respectivement aux parties N- et C-terminales de l'intéine DnaE (DnaEn et DnaEc). Les protéines X et Y sont liées à l'autre extrémité respectivement de DnaEn et DnaEc. L'interaction entre X et Y accélère le repliement des deux morceaux DnaEn et DnaEc qui induisent le « splicing » de la protéine. Le DL-DA active alors le gène rapporteur (Figure I-6).

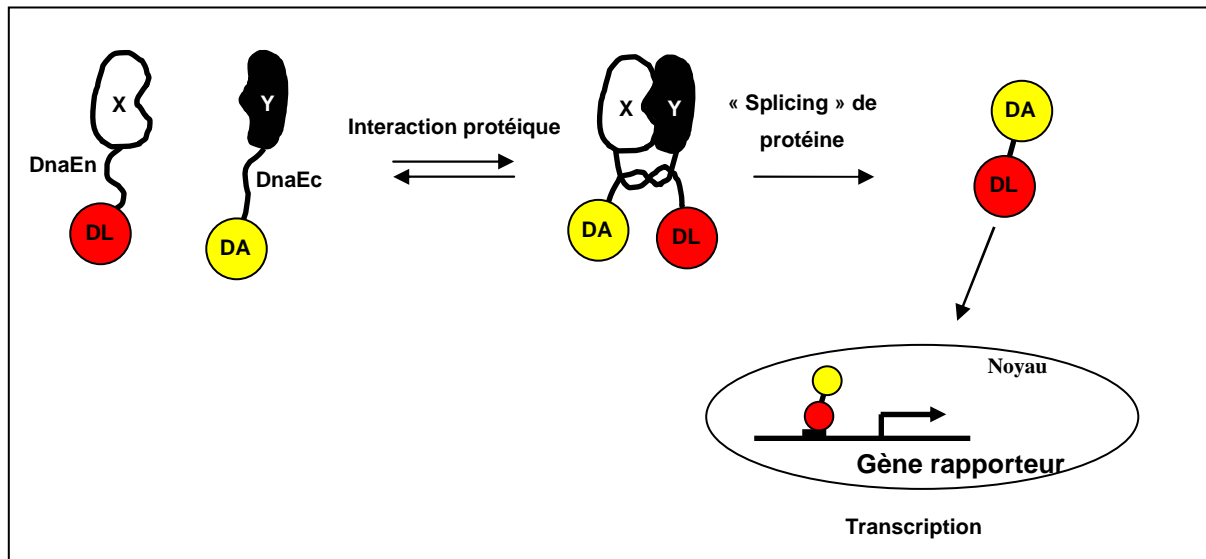


Figure I-6 Principe de la méthode de « splicing » de protéine.

Cette technique permet l'étude des interactions protéine-protéine dans les cellules de mammifères.

Actuellement, la détection des interactions protéine-protéine par criblage à haut débit est principalement réalisée avec les méthodes d'affinité couplées à la spectrométrie de masse et avec le double hybride. Cependant, d'autres méthodes existent comme le « phage display » et les méthodes d'identification sur support solide en plein développement.

I.A.4 Autres méthodes à haut débit

a. La méthodologie du « phage display »

Bien que la méthode de « phage display » soit principalement utilisée dans diverses applications comme l'optimisation de l'affinité d'anticorps pour leurs antigènes, l'évaluation

de médicaments potentiels et le criblage de nouveaux inhibiteurs, cette méthode peut également servir à la détection des interactions entre protéines [84-86].

Cette approche consiste à cloner le gène d'intérêt, en fusion avec un gène exprimant une protéine de la capsid du phage, dans un plasmide (phagémide) ou dans le génome du bactériophage. Lors de l'expression de la protéine de fusion, les peptides ou les protéines d'intérêt sont alors présentés en surface de la capsid [84]. Le nombre de copies de ligand par phages peut aller de 1 à 2700. Des banques de peptides aléatoires ou de domaines de protéines, mutés ou non de façon aléatoire sur un ou plusieurs résidus, exposés à la surface des phages, sont ainsi obtenues [87]. Ces banques sont sélectionnées sur des protéines cibles immobilisées sur microplaques (Figure I-7). Après de nombreux lavages, les phages fixés sont élués puis isolés et amplifiés par infection de bactéries. Les phages amplifiés sont sélectionnés à nouveau sur la même cible. Après trois à six tours de sélection-amplification, l'ADN des phages sélectionnés est analysé pour donner la séquence protéique correspondante. Des pressions de sélection peuvent être introduites à chaque tour ainsi qu'une diversité additionnelle par mutagenèse.

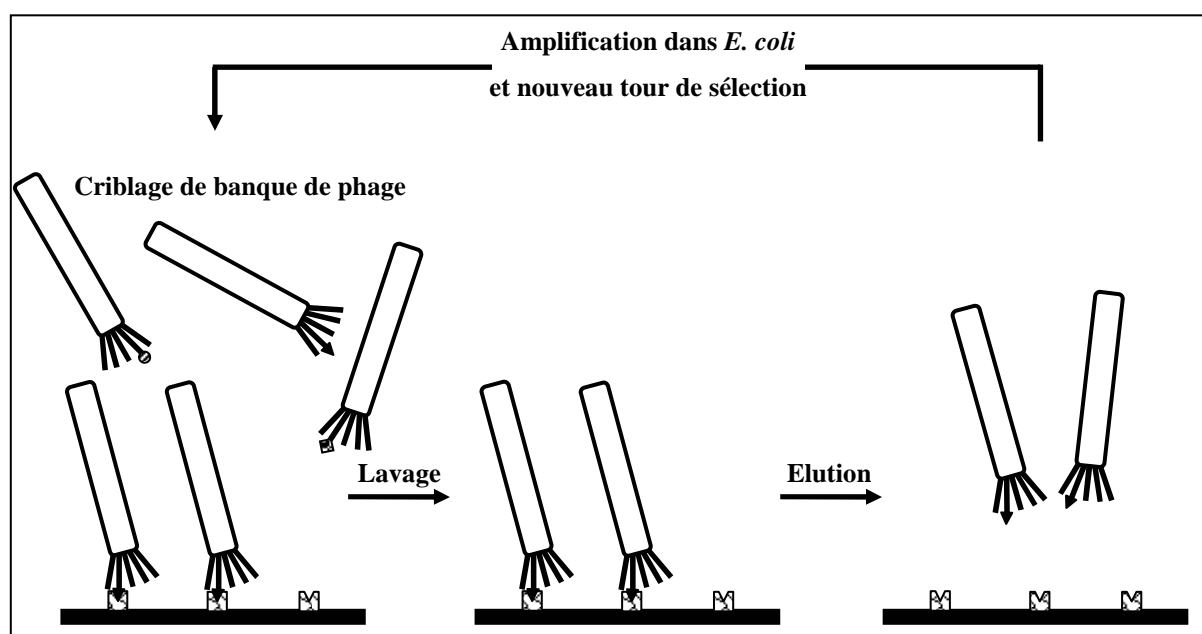


Figure I-7 Principe général de l'identification d'interaction protéine-ligand par « phage display ».

Cette stratégie permet de cribler plus de 10^{11} molécules recombinantes différentes [85]. Ce criblage à haut débit des interactions protéine-protéine peut être réalisé en construisant des banques de peptides [88, 89], d'ADNc [90] ou de fragments de génome [91]. Pour faciliter les

études à l'échelle du génome, des méthodes expérimentales ont été combinées, telles que le phage display et le double hybride, avec une approche informatique [89] ou le phage display avec de la synthèse peptidique à haut débit (Spot-synthesis) et un programme de reconnaissance de séquences protéiques [88]. Toutefois, l'utilisation de banques de peptides présente un certain nombre d'inconvénients. Des interactions non naturelles peuvent être détectées. Les deux partenaires peuvent être dans différents compartiments cellulaires, exprimés dans différents tissus ou à différentes périodes du développement. Le peptide détecté peut être enfoui dans la protéine dans des conditions physiologiques. Enfin, si l'interaction nécessite une plus grande surface pour être effective, un petit peptide ne suffira pas pour détecter l'interaction.

Pour leur part, les protéines d'intérêt exposées en surface peuvent présenter des problèmes de repliement, mais également être dégradées, et certaines protéines peuvent être toxiques pour le phage. De plus, la fusion d'une protéine hétérologue avec une protéine de la capsid virale peut aussi empêcher le bon assemblage du virus ou limiter l'infection de la bactérie.

Des systèmes similaires au « phage display » ont fait leur apparition. Ils emploient d'autres bactériophages [92, 93], des virus d'eucaryotes [94, 95], mais peuvent aussi présenter les peptides à la surface de bactéries, de levures [96] ou de cellules d'insecte [97].

b. « *In vitro* display »

Des techniques *in vitro* (« ribosome display », « mRNA display », « DNA display ») permettent d'éviter certains problèmes rencontrés par des techniques utilisant des étapes *in vivo* comme le « phage display » et le double hybride [98-101].

De manière générale, ces méthodes *in vitro* sont basées sur la sélection sur plusieurs cycles de protéines hybrides ayant une affinité pour la protéine cible immobilisée. Elles permettent de produire de larges banques de molécules hybrides où le génotype est directement lié au phénotype. Ainsi, lorsque la molécule hybride interagit *via* sa partie protéique avec la protéine fixée, l'ADN ou l'ARN de la molécule hybride sélectionnée est amplifié respectivement par PCR ou RT-PCR. Cette approche permet d'identifier directement la protéine impliquée dans l'interaction (Figure I-8).

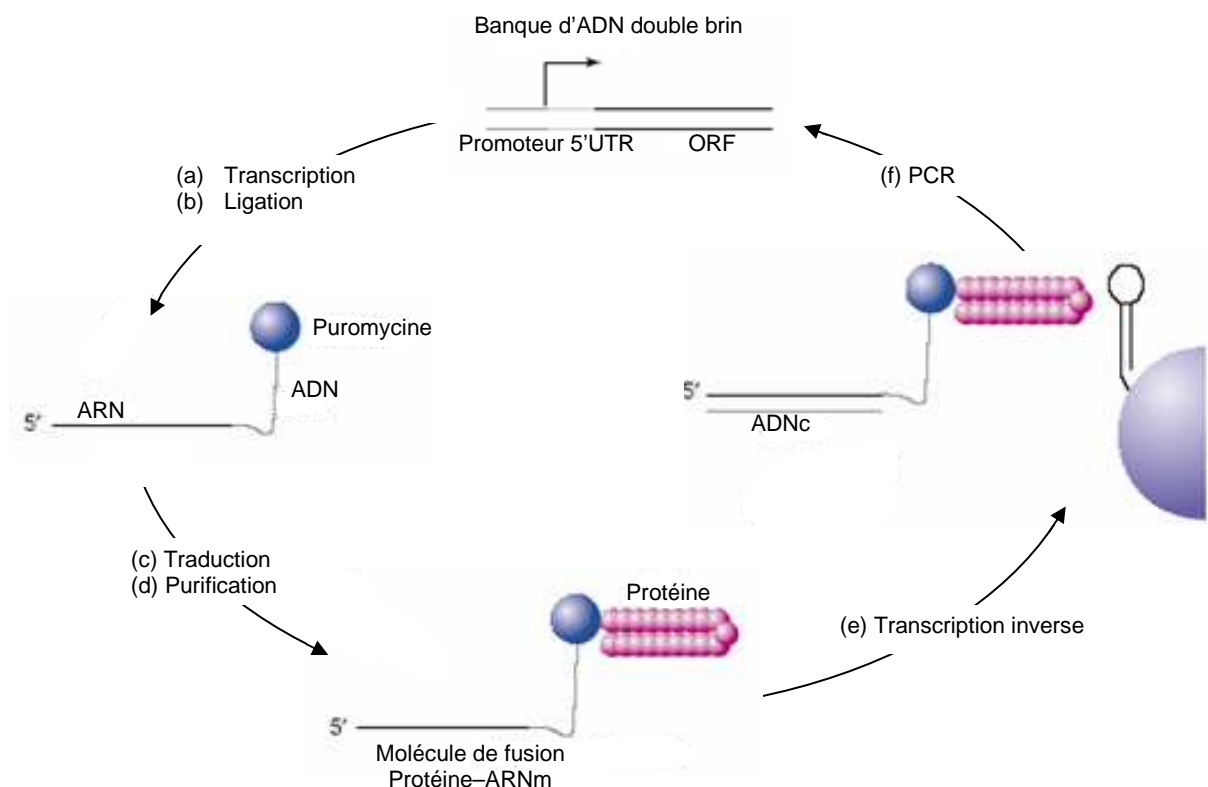


Figure I-8 Principe du « mRNA display » [102].

La méthode « mRNA display » permet la production à partir d'ADNc de banques de 10^{13} molécules hybrides. L'ARNm transcrit est traduit *in vitro* en une protéine qui reste liée à l'ARNm par l'intermédiaire d'une puromycine située à son extrémité 3' [102, 103].

Pour la technique de « ribosome display », la protéine reste liée au complexe ribosome-ARNm en bloquant dans la glace la traduction en fin de processus et en augmentant la concentration de magnésium pour stabiliser le complexe. Une amélioration stabilisant d'avantage le complexe ribosome-ARNm-protéine a permis l'identification d'interaction entre deux protéines membranaires [104]. Cette technique de « ribosome display » couplée à l'« alanine scanning » a aussi servi à la caractérisation d'interface protéique [105] (I.B.2b).

Enfin, pour la méthode « DNA display », l'ADN est construit fusionné à la biotine et contient la séquence d'une protéine fusionnée à la streptavidine. Lors de son expression, la protéine de fusion va se lier à son ADN par l'interaction streptavidine-biotine [101]. L'avantage de l'ADN sur l'ARN est qu'il est plus stable et qu'ainsi des conditions parfois plus dures peuvent être testées.

c. Identification à haut débit sur phase solide

Ces dernières années, des études ont été menées pour développer des méthodes permettant d'exprimer, de purifier et de fixer des protéines sur phase solide dans un format de criblage à haut débit de type plaques de 96 puits [106-109]. Une des techniques consiste à fixer une banque d'ADNc sur phase solide et à exprimer *in situ* la protéine d'intérêt fusionnée à une étiquette (antigène, biotine, ...) qui permet la fixation de la protéine sur son site de production [108, 110]. Le premier exemple de clonage et de purification systématique d'un protéome eucaryote entier a été réalisé en fixant environ 80 % des protéines exprimées dans *S. cerevisiae* [111].

La réalisation d'un criblage *in vitro* sur phase solide permet de contrôler les paramètres environnementaux de l'expérience comme la concentration en ions, le pH du tampon, l'addition de cofacteurs, et ce de manière fiable et reproductible. Mais surtout, cette technique a l'avantage d'exiger très peu de matériel protéique et de permettre l'étude des protéines membranaires. Toutefois, ces méthodes nécessitent d'avoir des techniques d'expression et de purification à haut débit de protéines natives avec un bon rendement. De plus, lors de l'immobilisation sur support solide, les protéines peuvent être altérées ou être orientées de telle manière que la zone d'interaction n'est pas accessible. Ainsi, des protéines inactivées ou dénaturées pourraient conduire à des faux positifs ou négatifs [110].

Malgré ces inconvénients potentiels, de récents exemples montrent qu'il est possible de détecter des interactions entre protéines à haut débit. Ainsi, 30 protéines impliquées dans la réplication de l'ADN ont été criblées les unes contre les autres de manière binaire et 110 interactions ont été détectées [108]. Un autre moyen est de fixer uniquement les domaines fonctionnels des protéines et de tester leur interaction par criblage avec des banques de protéines ou de peptides [112, 113].

La détection des interactions sur microplaque peut être réalisée par des marqueurs fluorescents, chimioluminescents, radioactifs, mais aussi par des techniques sans marquage telles que la résonance plasmonique de surface (SPR), la microscopie de force atomique (AFM) ou la spectroscopie d'impédance électrochimique. La méthode de fluorescence est souvent utilisée car elle est compatible avec les scanners laser de microplaques. Par exemple, la microplaque est incubée avec les protéines partenaires potentielles biotinylées, lavée plusieurs fois et incubée avec un marqueur fluorescent fusionné à une streptavidine. La

formation de l'interaction biotine–streptavidine permet de détecter par l'intermédiaire du fluorophore l'interaction spécifique entre la protéine cible et la protéine partenaire [111].

Actuellement, des études sont menées pour développer des techniques qui ne nécessitent pas de marqueurs, comme la résonance plasmonique de surface [25]. Cette méthode de détection sur phase solide sans marquage est la plus répandue. Les données cinétiques sont obtenues en mesurant, au voisinage de la surface où la protéine est immobilisée, le changement local de l'indice de réfraction (Figure I-9).

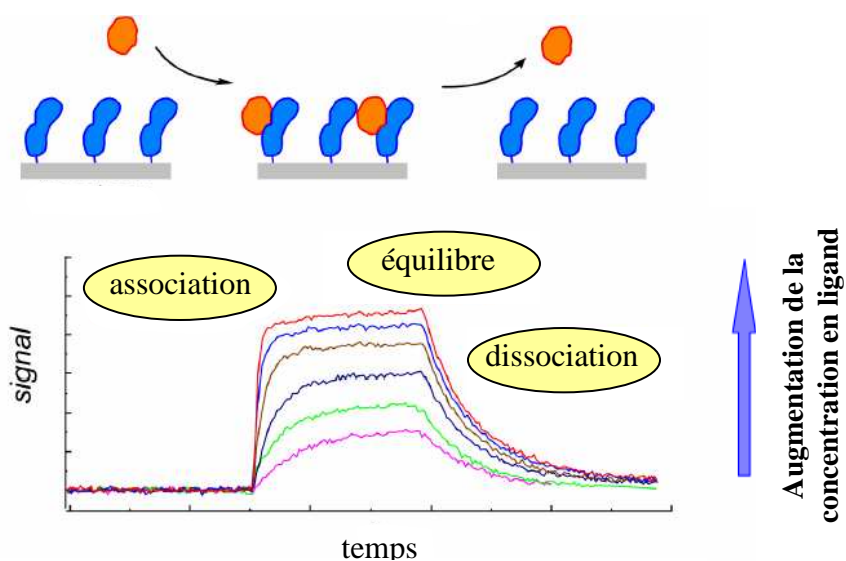


Figure I-9 Courbes typiques de liaison obtenues par résonance plasmonique de surface. L'indice de réfraction augmente lorsque des protéines se fixent sur la protéine cible immobilisée sur la phase solide. Les constantes d'association, d'équilibre et de dissociation en sont déduites.

Ce système automatisé permet l'injection de très petits volumes et se contente de faibles quantités de matière. Cette technologie peut être utilisée pour le criblage de mini-banques limitées actuellement à 64 molécules immobilisées [114, 115]. La spectrométrie de masse est fréquemment couplée à cette méthode pour identifier après élution les partenaires liés à la protéine cible [25, 116].

Une autre technique appelée spectroscopie d'impédance électrochimique permet de détecter les interactions protéine–protéine en mesurant les variations de résistance de transfert d'électrons à l'électrode de surface où est fixée la protéine [117]. Il existe toute une série d'autres techniques pour la détection des interactions protéiques couplées à un système de criblage à haut débit qui sont en cours de développement [25, 110].

Il existe beaucoup de méthodes permettant d'obtenir des informations sur l'identité des protéines impliquées dans les interactions à petite ou à grande échelle. Une seconde étape, non moins importante, est de caractériser le plus résolument possible les acides aminés impliqués dans la zone d'interaction. Ces résultats permettront à la fois de mieux comprendre les phénomènes intracellulaires liés aux interactions protéiques et de faciliter par exemple le développement de nouveaux médicaments en se basant sur les informations structurales obtenues.

I.B Caractérisation structurale des interactions protéine-protéine

La caractérisation des zones d'interaction peut se faire avec différentes techniques qui permettent d'obtenir des niveaux de précision et de résolution variables. Ainsi, des méthodes couplées à la spectrométrie de masse telles que le « cross-linking », le « footprinting » par clivage ou par oxydation par les radicaux hydroxyle et l'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ sont utilisées seulement pour caractériser les zones d'interaction, alors que la microscopie électronique, la RMN et la cristallographie par diffraction de rayons X permettent d'obtenir les structures des complexes avec des résolutions variables.

Avec une résolution faible ($> 12 \text{ \AA}$), seule la forme générale du complexe ou de larges composants peut être dessinée. A plus haute résolution, entre 10 et 6 \AA , il est permis de pouvoir repositionner des domaines et des structures secondaires comme les hélices α ou les feuillets β . Mais il faut atteindre une résolution inférieure à 6 \AA pour pouvoir distinguer le pas de l'hélice, commencer à observer individuellement les chaînes latérales volumineuses de manière non résolue et inférieure à 4,7 \AA pour voir les feuillets individuellement. La Figure I-10 représente à titre indicatif les niveaux de détails obtenus pour la chaîne latérale d'un tryptophane à un nombre d'angström donné. La résolution est considérée comme étant bonne en dessous de 3 \AA .

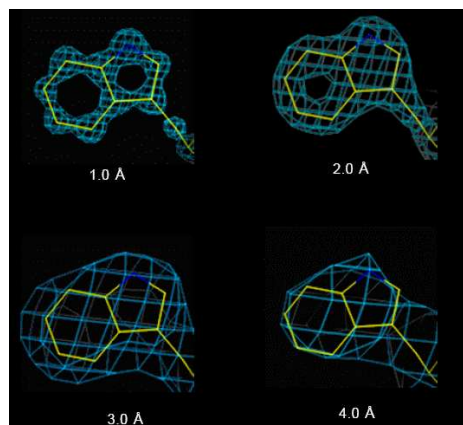


Figure I-10 Différents niveaux de résolution d'un résidu tryptophane.

Dans un premier temps, les techniques permettant d'obtenir les structures globales des complexes seront exposées. Les méthodes caractérisant les zones d'interactions seront ensuite décrites.

I.B.1 Caractérisation de structures de complexes protéiques

a. La microscopie de force atomique (AFM)

La microscopie de force atomique est une technique qui permet de visualiser la topologie de la surface d'une molécule seule (Figure I-11 A.) [118]. Elle permet aussi de détecter l'interaction d'une molécule avec une autre en fixant la protéine partenaire sur la pointe (Figure I-11 B.).

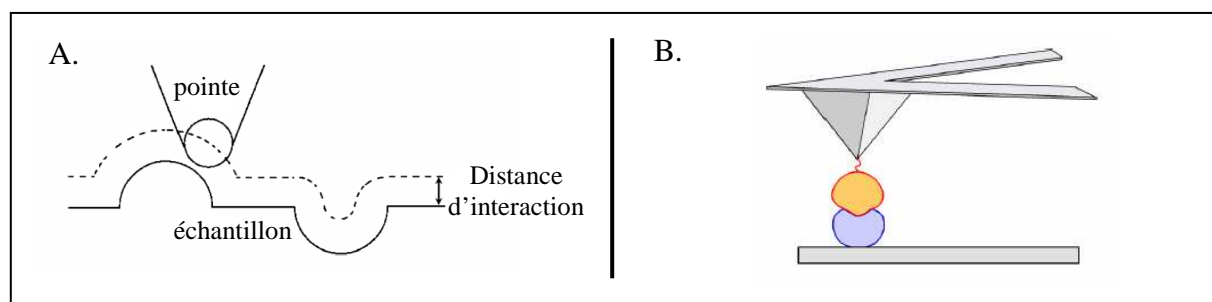


Figure I-11 A. Visualisation de la topologie d'une molécule par AFM ; B. Détection d'une interaction protéine-ligand par AFM.

L'opération de base implique l'utilisation d'une pointe nanométrique accrochée à l'extrémité d'une baguette flexible en porte-à-faux, hautement sensible à la force entre la pointe et l'échantillon à analyser (Figure I-12). Le mouvement de la pointe, qui permet la

génération de l'image, est contrôlé dans les directions x, y, z d'un cristal piézoélectrique et un laser permet de détecter les distorsions du porte-à-faux par rapport à l'échantillon.

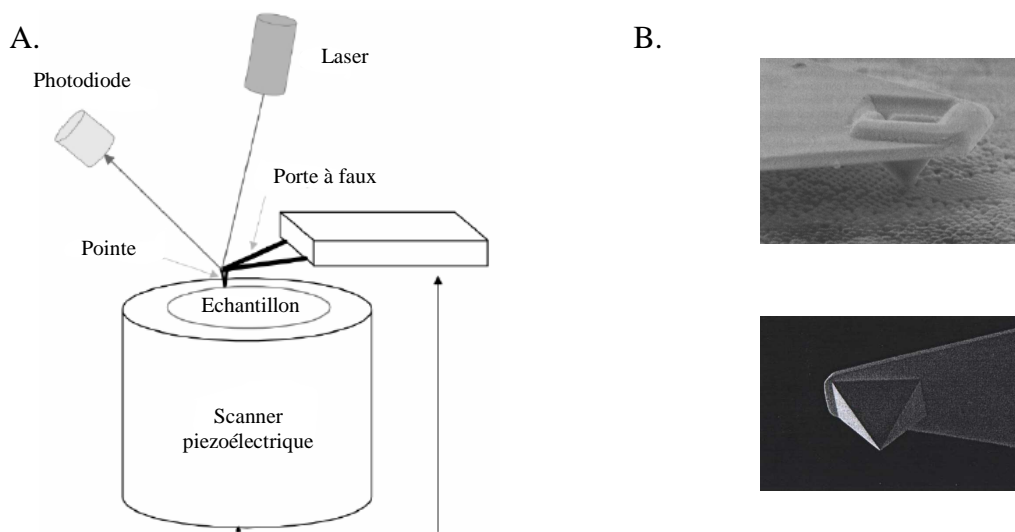


Figure I-12 A. Représentation schématique du dispositif de l'AFM ; B. Pointes.

Cette méthode permet d'obtenir des images des structures de protéines membranaires, de grosses protéines ou de larges complexes avec une résolution subnanométrique, mais peut aussi suivre leurs changements de conformation *in situ* [118]. Elle permet de suivre en temps réel la dynamique des interactions protéine-protéine. La force des interactions peut être caractérisée très précisément (jusqu'au piconewton) [119].

b. La microscopie électronique

La visualisation de l'échantillon à analyser se déroule selon le protocole général suivant. Les protéines partenaires d'intérêt, purifiées à homogénéité, sont préparées afin de les rendre moins sensibles à la dégradation générée par les radiations causées par le flux d'électrons. Ces protéines peuvent subir une coloration négative en présence de sels de métaux lourds, technique connue sous le nom de « negative staining ». Cette technique permet d'obtenir un bon contraste et ainsi d'analyser de petites structures. Par contre, elle a tendance à modifier la surface de l'échantillon à analyser. La seconde méthode est connue sous le nom de cryo-microscopie électronique. La structure de l'échantillon vitrifié est parfaitement préservée et permet d'obtenir une bonne résolution, mais cette technique a l'inconvénient majeur d'avoir peu de contraste et ne peut donc pas analyser les petites structures.

Les échantillons préparés sont adsorbés sur la grille de microscopie électronique couverte par un film fin de carbone qui peut contenir de petits puits dans le cas où les échantillons sont cryogénisés. Le complexe protéique est visualisé sous le microscope électronique, dans l'idéal sous tous les angles, afin de pouvoir reconstituer une image en trois dimensions. L'acquisition d'un maximum d'images pour chaque orientation est nécessaire pour obtenir la meilleure résolution possible en moyennant les images du complexe d'une même orientation. Les différentes vues sont alors agencées pour permettre une reconstitution tridimensionnelle du complexe (Figure I-13).

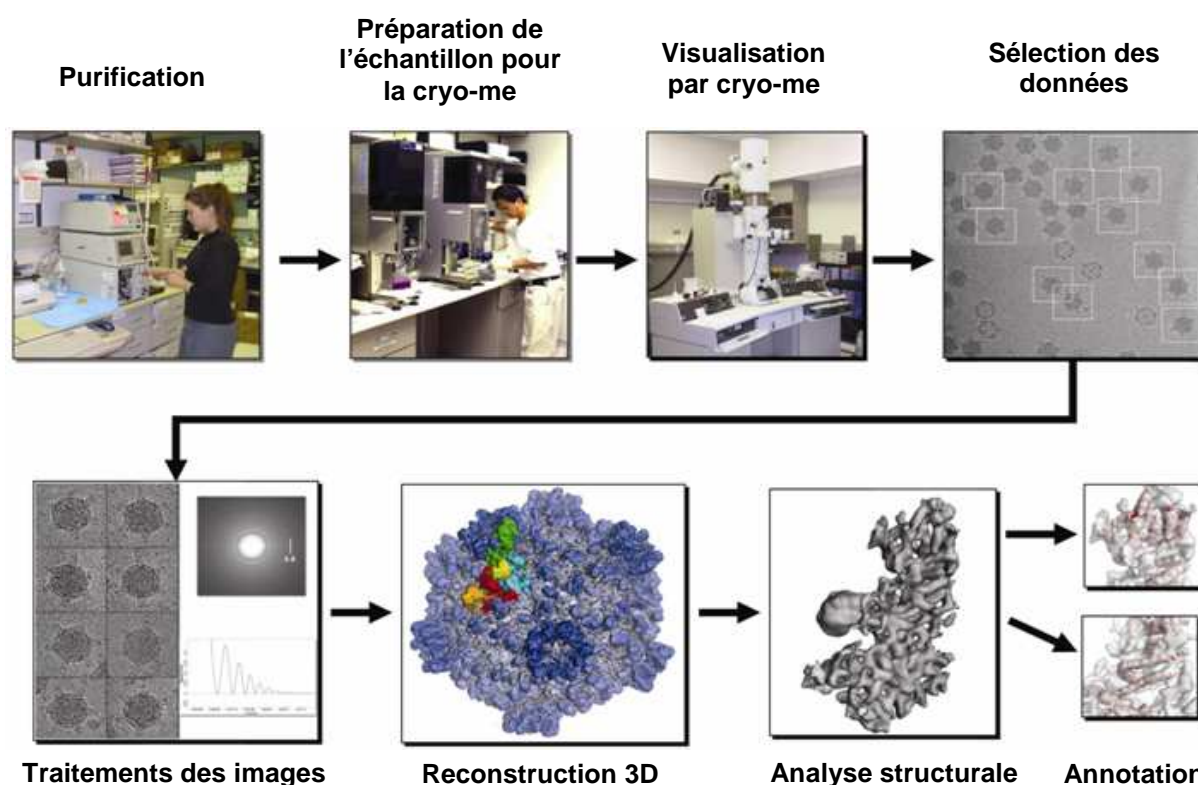


Figure I-13 Procédure générale utilisée en cryo-microscopie électronique (cryo-me) et pour la reconstruction 3D.

Afin de limiter les dommages subis par l'échantillon, il est soumis à un faible taux d'électrons, ce qui cause une augmentation du bruit de fond. De plus, pour augmenter le contraste qui fait défaut, l'échantillon est analysé intentionnellement avec une mise au point plus faible. L'ensemble de ces deux points limite la résolution de la structure tridimensionnelle finale. Bien que la limite actuelle des microscopes électroniques permette une résolution inférieure à 2,5 Å, une résolution autour de 10 Å en moyenne, avec des maxima autour de 7 Å est atteinte.

Seules les grosses macromolécules remplissent les critères nécessaires pour être extraites et analysées car elles permettent d'être visualisées au dessus du bruit de fond.

En règle générale, la microscopie électronique est utilisée pour visualiser des molécules d'au moins 200 à 300 kDa [120]. Par exemple, le complexe de 231 kDa de sept sous-unités Arp2/Arp3, impliqué dans la nucléation pour l'assemblage des filaments d'actine, a été obtenu avec une basse résolution d'environ 20 Å par « negative staining » [121]. Cette étude a le mérite de souligner certains avantages de la microscopie électronique vis-à-vis de la cristallographie par diffraction de rayons X. En effet, contrairement à cette dernière qui permet généralement d'obtenir uniquement la conformation qui se prête le mieux à la cristallisation, la microscopie électronique a permis de visualiser les trois conformations dynamiques du complexe sous forme ouverte, intermédiaire et fermée. Des expériences appropriées ont notamment permis d'obtenir des informations mécanistiques en caractérisant la forme fermée comme étant la forme active. Un des arguments avancés est que la structure aux rayons X de la forme inactive du complexe Arp2/3 ne peut correspondre qu'à la forme ouverte.

Un autre avantage de la microscopie électronique est justement qu'elle peut être couplée à des données de structure obtenues notamment par cristallographie [122]. La microscopie apporte une forme générale des différentes conformations du complexe, et les données de cristallographie permettent, après docking, d'affiner à une résolution « pseudo-atomique » la structure d'une conformation donnée. En résumé, cette technique de microscopie électronique permet d'étudier toutes les conformations d'une protéine à une résolution moyenne de 10 Å, à partir de très faibles quantités de matière. Elle est notamment très bien adaptée pour l'étude de gros complexes présentant beaucoup de protéines hétérogènes difficiles à purifier et à cristalliser et est ainsi une alternative intéressante, de moindre résolution, à la RMN et à la cristallographie par diffraction de rayons X [120, 123]. Toutefois, les prochaines avancées techniques devraient permettre d'approcher dans le futur une résolution de 4 Å. En conclusion, la microscopie électronique permet d'obtenir des informations de structure sur les complexes protéiques en disposant du même coup des informations sur leurs interfaces. Des exemples de complexes sont notamment cités dans deux revues récentes [120, 124].

c. La méthode de diffusion de rayons X ou de neutrons aux petits angles (Small-angle X-ray or Neutron Scattering (SAXS or SANS))

Apparue dans les années 30, cette méthode s'est développée dernièrement pour étudier la structure des macromolécules et complexes à de basses résolutions (10 à 30 Å) en solution dans des conditions proches du physiologique [125]. Les données de dispersion obtenues par SAS en une dimension sont reconstruites par modélisation moléculaire en trois dimensions pour donner des informations sur la taille et la forme globale du complexe étudié. Cette méthode est souvent couplée au dichroïsme circulaire et à l'ultracentrifugation analytique qui donnent respectivement la structure secondaire et des informations de taille et d'anisotropie. Elle permet de suivre en temps réel les changements de conformations et l'assemblage de complexes. De plus, elle est très utile pour caractériser quantitativement les mélanges de différentes macromolécules ou les états d'agrégaions et les diverses conformations d'une même protéine. Sa capacité à obtenir des informations de structure en solution sur des domaines flexibles difficilement cristallisables lui permet de compléter les informations obtenues par cristallographie par diffraction de rayons X et de contrôler en solution les effets éventuels de la cristallisation sur la structure [126]. L'utilisation de SAXS et SANS combinée à la deutériation sélective d'un des deux partenaires du complexe permet de différencier les informations de structure et de position obtenues pour chacune des deux protéines [125, 127]. En conclusion, cette technique permet d'obtenir des informations structurales de basse résolution sur une très large gamme de tailles avec des exemples dans la littérature allant de 6,5 kDa pour la protéine BPTI à 2,3 MDa pour le ribosome [125].

d. La cristallographie par diffraction de rayons X

La cristallographie par diffraction de rayons X est l'une des deux méthodes les plus résolutes, avec la RMN, pour caractériser les structures de protéines et de complexes. Elle repose sur l'irradiation d'un cristal de protéine (arrangement périodique tridimensionnel des molécules de protéines) par un faisceau de rayons X monochromatiques généré par un synchrotron. L'image de diffraction, collectée par un détecteur de type caméra CCD, est retranscrite sous forme d'une carte de densité électronique qui permet ensuite de générer la structure du complexe en trois dimensions (Figure I-14).

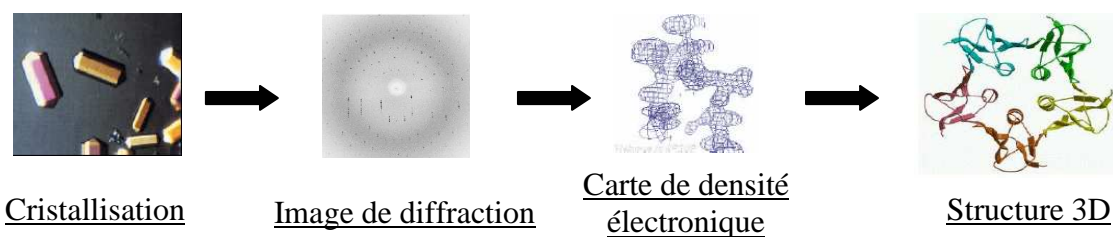


Figure I-14 Du cristal à la structure tridimensionnelle.

La cristallographie par diffraction de rayons X demande une grande quantité de protéines (de l'ordre de 5 à 10 mg) de grande pureté et de qualité monodisperse². Ces exigences sont nécessaires pour obtenir des cristaux de taille et de qualité correctes. Le principal problème de cristallisation provient de la polydispersité du complexe à analyser (moins de 10 % de succès de cristallisation). Des protéines monodisperses présentent généralement 70 % de chance de cristalliser [128]. Après purification des protéines, différentes conditions sont testées (force ionique, pH, température, concentration, nature du précipitant, détergents,...) pour amorcer et optimiser la cristallisation des complexes [129, 130]. Du fait du nombre important de conditions à tester, cette étape est souvent automatisée sur microplaques avec un robot [131, 132]. Les protéines peuvent être modifiées en remplaçant par exemple un résidu hydrophobe de surface par un acide aminé chargé pour réduire les risques d'agrégation. Les régions flexibles des protéines, qui empêchent ou limitent la cristallisation, peuvent être enlevées par des techniques de génétique recombinante [128]. L'obtention du cristal lève le principal problème pour obtenir la structure d'une protéine, mais d'autres problèmes secondaires subsistent. La dégradation du cristal causée par une longue exposition aux rayons X peut être limitée en collectant les données à partir d'un cristal congelé dans une solution protectrice (glycérol, sucrose, éthanol,...) à des températures cryogéniques.

Un autre problème en cristallographie est connu sous le nom de problème de phase. Les cristallographes ont mis au point quelques méthodes pour obtenir cette information de phase comme le « Multiple Isomorphous Replacement » (MIR) et des variantes (SIR, SIRAS, MIRAS), la méthode « Single- or Multiple Anomalous Dispersion » (SAD ou MAD) et le « Molecular Replacement » (MR) [133]. Cette méthode, qui permet d'obtenir de hautes

² Un échantillon protéique est dit monodisperse quand il est pur, homogène, proprement replié, de stoechiométrie connue, dans un seul état de conformation et avec le moins de disparités possibles au niveau des modifications post-traductionnelles.

résolutions de complexes protéiques, a comme dernier inconvénient de nécessiter beaucoup d'heures de travail.

Toutefois, il existe un nombre de plus en plus important de structures de complexes protéiques. Récemment, la structure du complexe entre la protéine chaperonne Asf1 et le dimère d'histones H3/H4 a été obtenue à une résolution de 1,7 Å [134]. Une autre étude a permis d'éclaircir le phénomène d'exportation de macromolécules du noyau au cytoplasme en caractérisant la structure à 2 Å d'un pore nucléaire constitué de l'exportine Cse1p complexée avec la protéine cargo Kap60p et la protéine RanGTP [135].

e. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La Résonance Magnétique Nucléaire, est avec la cristallographie par diffraction de rayons X, l'une des méthodes les plus résolutive. Les études sont réalisées en solution et permettent de détecter de faibles interactions protéiques (nM à mM) [136]. Les résonances de chaque noyau de la protéine, suivies individuellement, permettent d'obtenir une résolution atomique pour l'ensemble de la structure. L'étude des voisins, de la mobilité et des changements du noyau étudié permet respectivement d'obtenir des informations structurales, dynamiques et sur les interactions et les modifications de conformations.

• Caractérisation de structure

L'expérience classique NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permet d'accumuler en une seule expérience des milliers de distances interprotons NOE (<5 Å) pour caractériser la structure tridimensionnelle d'un complexe. Cette méthode nécessite le marquage isotopique d'une des deux protéines du complexe, ce qui permet de discriminer les NOEs entre les deux macromolécules.

Le développement de RMN multidimensionnelles (3D et 4D) et l'utilisation de marquages isotopiques sélectifs (^{15}N , ^{13}C), exploitant les transferts de magnétisation entre les noyaux ^1H , ^{15}N , ^{13}C voisins, facilitent l'acquisition et l'interprétation de toutes les résonances de protéines jusqu'à 40 kDa.

Mais, avec l'augmentation de la taille des complexes à étudier, le nombre de résonances devient si important que des chevauchements de signaux apparaissent. De plus, les signaux relaxent plus rapidement provoquant un élargissement et une perte de sensibilité de ces

signaux. Dans le but d'étudier les gros complexes, la méthodologie TROSY (Transverse Relaxation-Optimized SpectroscopY) est apparue. Cette technique exploite les principes physiques de la relaxation du spin nucléaire pour augmenter artificiellement les temps de relaxation des noyaux ^{15}N , ^1H , et parfois ^{13}C , un phénomène qui atteint son effet maximum à haut champ magnétique. Cette technique permet ainsi d'analyser des complexes de très haut poids moléculaire avec une grande résolution. La deutériation partielle à 70 % ou totale de la molécule, le marquage inventif et les séquences de pulses avancées telles que methyl TROSY, CRIPT ou CRIPTNEPT permettent maintenant de caractériser des complexes proches du million de daltons tel que le complexe GroEL–GroES de 900 kDa mais aussi de larges complexes membranaires [137-139]. Cette méthode a néanmoins comme principal inconvénient de nécessiter des quantités de protéines de l'ordre de plusieurs mg.

- **Caractérisation d'interface**

La RMN peut utiliser des méthodologies plus rapides et moins résolutive dans le but unique de caractériser l'interface de l'interaction entre deux protéines [140]. La plus connue, la perturbation du déplacement chimique (CSP : Chemical Shift Perturbation) permet d'obtenir une carte détaillée de la zone d'interaction en réalisant une expérience en deux dimensions ^{15}N - ^1H -HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) (Figure I-15). Un titrage est réalisée sur une protéine A marquée ^{15}N en absence et en présence d'une quantité croissante de protéine B non marquée. La présence du partenaire d'interaction B induit des variations des déplacements chimiques des noyaux ^1H et ^{15}N des acides aminés situés dans la zone d'interaction. Toutefois, des changements de conformations dans une autre zone de la protéine induisent, eux aussi, des variations de déplacements chimiques. L'expérience inverse permet d'obtenir les informations sur l'autre protéine.

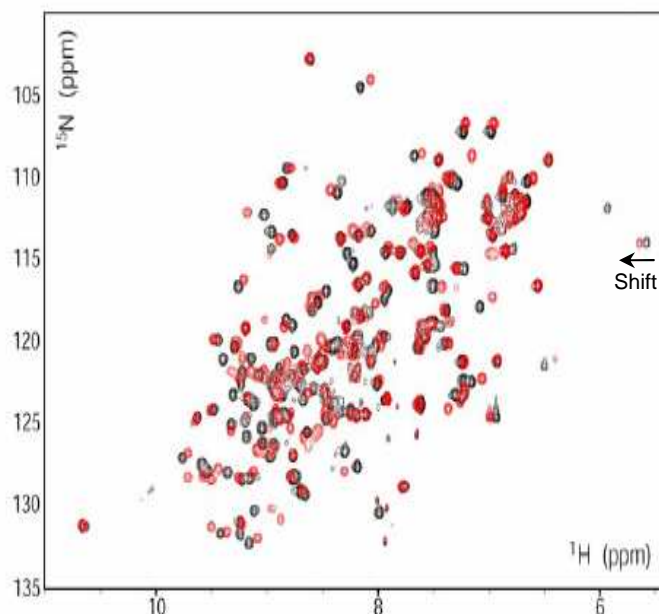


Figure I-15 Cartographie des déplacements chimiques de la protéine A marquée ^{15}N d'un complexe protéique obtenue par une expérience ^1H - ^{15}N -HSQC. Les déplacements chimiques de la protéine A sont enregistrés avec (rouge) ou sans (noire) protéine partenaire B non marquée. Le « shift » (déplacement chimique) indique que le résidu est en interaction ou situé dans une zone de changement de conformation.

Les expériences de saturation croisée ou de transfert de saturation permettent aussi d'obtenir des informations d'interface plus fiables car elles ne sont pas faussées comme pour les CSP par des changements de conformations éventuels qui interviennent en dehors du site d'interaction. Cette méthode exige que la protéine A soit marquée ^{15}N et perdeutérée à l'exception des hydrogènes des amides. Les résonances des protons aliphatiques du partenaire donneur B non marqué sont saturées par irradiation à une certaine longueur d'onde. Le mécanisme de relaxation croisée transfère la saturation du donneur B vers les protons des amides de l'accepteur A. Cette expérience mesurée par ^1H - ^{15}N -HSQC ou ^1H - ^{15}N -TROSY permet de suivre une diminution d'intensité des signaux émis par les résidus de la protéine A proches de la zone d'interaction (Figure I-16) [141].

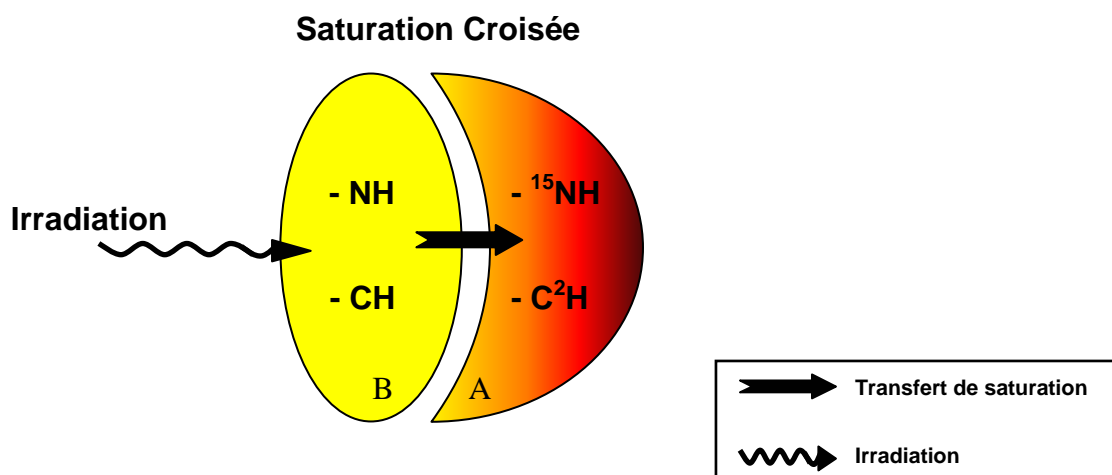


Figure I-16 Principe de la méthode de saturation croisée.

Des informations sur des résidus impliqués dans une interaction peuvent aussi être obtenues en suivant la différence de vitesse d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ selon que les résidus sont complexés et protégés ou non.

La zone d'interaction entre deux protéines peut être aussi cartographiée en utilisant le paramagnétisme de certains composés. Des ions paramagnétiques en solution induisent l'élargissement des pics des résidus en surface. Cet effet est causé par l'interaction dipolaire transitoire électron/noyau. Les résidus en contact dans l'interface ne seront pas touchés par ce phénomène [142].

Des expériences de mesure de constante de couplage dipolaire résiduel (Residual Dipolar Coupling RDC) ou de mesure d'anisotropie de diffusion permettent d'obtenir des informations d'orientation d'une protéine par rapport à l'autre [143].

La RMN et la cristallographie par diffraction de rayons X sont sans conteste les deux meilleures méthodes actuelles pour caractériser les structures de complexes avec une très haute résolution. Toutefois, ces deux méthodes nécessitent beaucoup de temps et de grandes quantités de protéines, de l'ordre de plusieurs milligrammes, exigeant leur surexpression. Toutes les protéines ne peuvent être surexprimées aisément et le coût d'expériences impliquant des protéines marquées ^{15}N , ^{13}C ou perdeutérées pour la RMN peut être prohibitif. De plus, la RMN présente des difficultés pour étudier facilement les complexes supérieurs à 50 kDa. La difficulté d'obtenir des cristaux, notamment à cause du désordre dû à la flexibilité

de conformation de certaines protéines, empêche d'obtenir des structures pour toutes les protéines en interaction avec la méthode par diffraction de rayons X.

L'utilisation de méthodes alternatives est donc nécessaire pour apporter des informations permettant de caractériser même partiellement ou de manière moins résolutive les interfaces protéiques. Ces méthodes permettent généralement d'identifier les zones d'interaction ou même parfois les acides aminés réellement nécessaires à l'interaction. Les principales techniques sont présentées dans le paragraphe suivant.

I.B.2 Caractérisation d'interface protéique

a. « Site-Directed Spin Labelling » (SDSL) et Résonance Paramagnétique d'Electron (RPE)

Cette technique de RPE nécessite d'introduire spécifiquement sur un résidu de la protéine un marqueur avec un spin électronique. La méthodologie générale consiste à remplacer par mutation un résidu acide aminé par une cystéine qui se lie par un pont disulfure avec une molécule portant un radical nitroxyde (Figure I-17). Le signal émis par ce spin, enregistré par RPE, est sensible à différents facteurs comme la mobilité des chaînes latérales, la fluctuation des chaînes principales, les changements globaux de conformation et les variations générées par une interaction. Les spectres de RPE obtenus ont des formes de courbes caractéristiques d'un état donné. Cette méthode de « site-directed spin labelling » apporte donc des données de mobilité, de dynamique, d'orientation, de position, d'accessibilité et des informations de distances (de 8 à 70 Å) quand deux sondes spins sont introduites sur la protéine [144-146].

Cette méthode permet d'étudier les structures de protéines membranaires et solubles, l'interaction des protéines avec la membrane et les interactions protéine-protéine [145]. Deux exemples récents illustrent ce dernier point avec l'étude d'interaction, à une résolution du résidu acide aminé, entre SecA-SecB et entre l'arrestine et les formes actives et inactives de la Rhodopsine phosphorylée [144, 147]. L'utilisation conjuguée de cette méthode avec la modélisation moléculaire a permis d'obtenir un modèle de structure à une résolution à l'échelle atomique [148].

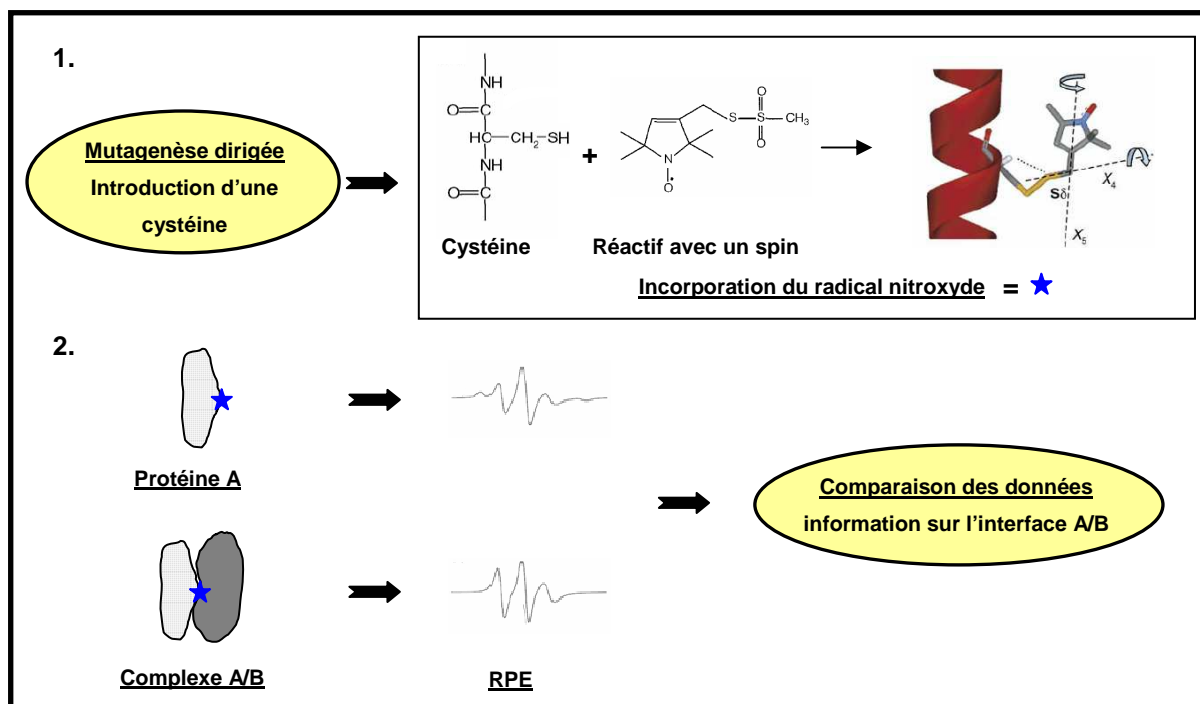


Figure I-17 Protocole général pour l'étude des interactions protéiques par « Site-Directed Spin Labelling ».

Une méthode analogue dans le concept utilise la fluorescence pour apporter des données de structure. Un marqueur fluorescent est attaché sur le site muté par une cystéine pour servir de sonde de l'environnement local. Des informations sur l'accessibilité de surface aux solvants sont obtenues en comparant les différences entre les valeurs d'émission λ_{max} de fluorescence ou les changements dans les valeurs d'anisotropie [149]. Ces deux sources d'informations permettent de remonter à la structure secondaire dans la zone du marqueur fluorescent. Des informations localisées sur la structure tertiaire, sous forme de distance, peuvent être aussi obtenues. En effet, les résidus tryptophane diminuent l'intensité de fluorescence de la sonde en fonction de leur distance par rapport à ce marqueur fluorescent, un dérivé du bimane. Ainsi, une échelle de distance entre le tryptophane et le bimane est réalisée, définie comme « éloigné » ($> 15 \text{ \AA}$), « proche » ($10 \text{ à } 15 \text{ \AA}$), ou très proche ($5 \text{ à } 10 \text{ \AA}$) [149, 150]. Ces données permettent d'obtenir des informations de changements de conformation, de repliement de structure et d'interaction protéine-protéine. A ce jour, peu d'études sur la caractérisation d'interface entre protéines ont été faites avec cette méthode de fluorescence. En combinaison avec la méthode de RPE, l'interaction dynamique actine-myosine impliquant deux sites de liaisons a été étudiée [151]. L'étude de la structure hexamérique de la glucosamine 6-phosphate désaminase a permis de mettre en évidence un conformère R induit par le site allostérique et un conformère R' induit par un site actif [152].

b. Caractérisation des zones d'interaction par « alanine scanning »

Une méthode très utilisée pour déterminer l'importance de tel ou tel acide aminé dans l'interaction est de réaliser de la mutagenèse dirigée. L'approche consiste à remplacer un par un tous les acides aminés de la zone d'interaction par une alanine. Cette substitution permet de retirer tous les atomes en aval du carbone β , ce qui permet d'évaluer le rôle et l'influence de chaque chaîne latérale des acides aminés [153]. Cette technique appelée « alanine scanning » combinée à une méthode à haut débit, le « phage display », donne naissance à une troisième technique « alanine shotgun scanning ». Il est ainsi possible de mettre en évidence les acides aminés impliqués dans les interactions protéiques [85, 154].

Dans des phages, une banque de clones mutés sur un ou plusieurs résidus à la fois est alors criblée sur une protéine cible et l'ADN des clones sélectionnés est séquencé. Le rapport résidus mutés sur résidus non mutés pour chaque position permet de calculer la contribution d'énergie de liaison de chaque chaîne latérale. Cette méthode permet d'obtenir rapidement des informations sur les acides aminés réellement impliqués dans l'interaction et d'élaborer des hypothèses pour mener des études quantitatives plus poussées en mutant spécifiquement tel ou tel acide aminé. Ce procédé présente l'avantage de ne pas nécessiter de purifications de protéines. Il permet, dans le cas où la zone d'interaction est connue, de différencier les acides aminés en contact de ceux qui sont vraiment utiles pour l'interaction. Une zone présentant une vingtaine d'acides aminés peut être étudiée en moins d'un mois en réalisant une seule banque de phage [154].

Une étude récente a permis de caractériser l'interaction entre les protéines EntB-ArCP impliquées dans la survie d'*E. coli* sur un milieu dépourvu de fer [155]. Cette technique peut être utilisée pour étudier un complexe non caractérisé. L'étude de l'interaction impliquant une protéine de 200 résidus pourrait être réalisée en réalisant dix banques correspondant à la mutation d'une zone de vingt résidus contigus [154]. Une variante, appelée « homolog shotgun scanning » consistant à muter un acide aminé en un autre de structure proche (par exemple une Phe en Tyr), donne accès à des informations supplémentaires plus détaillées sur le résidu concerné [156]. La technique « alanine scanning » couplée avec le « ribosome display » a aussi permis de caractériser une zone d'interaction [105]. Ces expériences de mutagenèse permettent d'obtenir des informations au niveau du résidu acide aminé, mais les modifications de structure éventuelles consécutives à la mutation doivent être vérifiées.

c. Caractérisation par spectrométrie de masse

i. « Cross-linking »

La technique de « cross-linking³ » consiste de manière générale à établir un lien covalent entre les protéines en complexe par l'intermédiaire de réactifs, à réaliser ou non une séparation sur gel SDS-PAGE, à les protéolyser et enfin à analyser les peptides obtenus par spectrométrie de masse (Figure I-18).

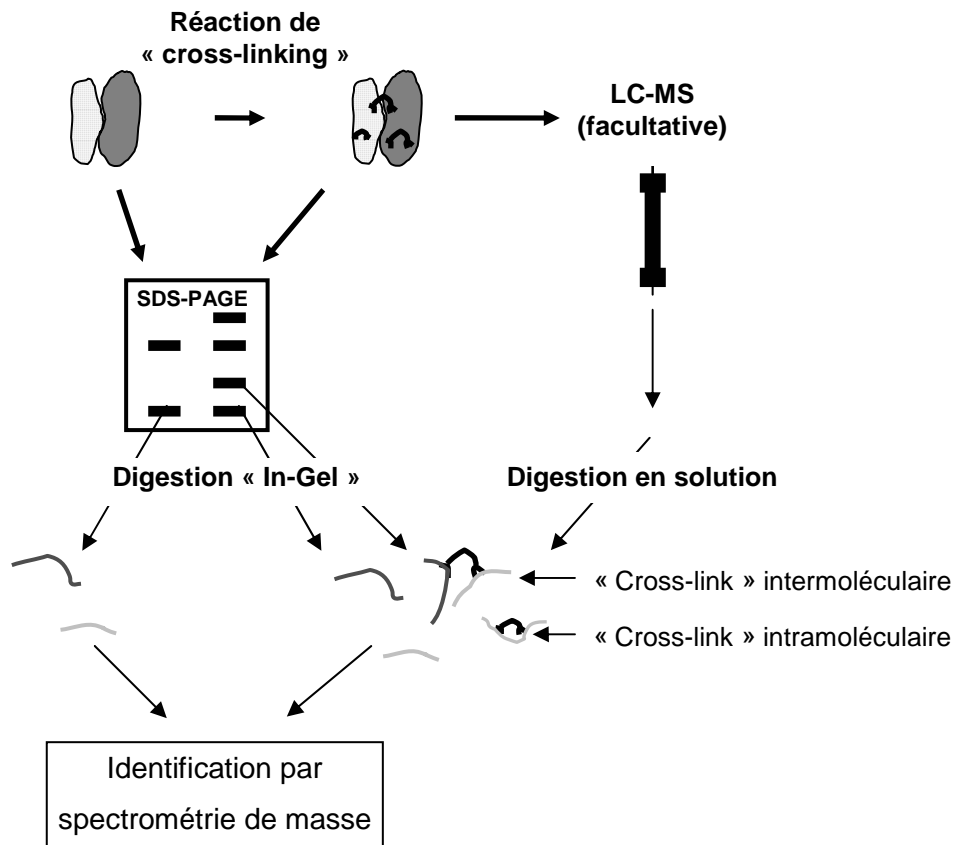


Figure I-18 Protocole général pour une expérience de « cross-linking ».

En théorie, la connaissance de la structure des deux partenaires seuls et l'obtention de suffisamment d'informations sur les distances peuvent permettre de modéliser une structure tertiaire de basse résolution dont la précision est liée directement au nombre de données acquises [157] (Figure I-19). Une structure de haute résolution plaçant chaque résidu acide aminé est obtenue en utilisant 3N contraintes de distance, où N est le nombre de résidus. Seule l'utilisation de N/10 peptides liés covalamment suffit pour déterminer une structure de basse résolution [158].

³ Les termes anglais « cross-linking » et « cross-link » seront utilisés par la suite pour simplifier l'expression.

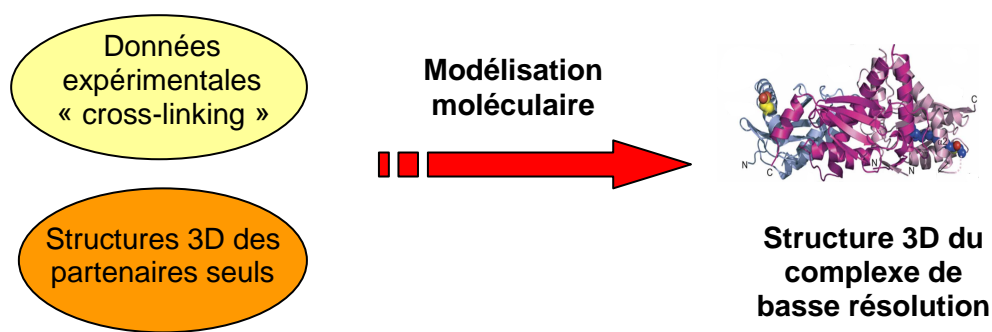


Figure I-19 Modélisation de la structure 3D d'un complexe protéique à partir de données de « cross-linking ».

Une large gamme de réactifs permet de former des liens de tailles définies allant de un à quelques dizaines d'angström. Cette différence de longueur permet d'estimer la distance entre deux résidus acides aminés et ainsi de dessiner une carte d'interaction entre deux protéines. Les protéines doivent présenter des acides aminés réactifs (lysine, cystéine) à leur surface en quantités suffisantes et bien répartis dans la zone d'interaction. Parfois, il est nécessaire de muter la protéine pour enlever toutes les cystéines de surface et pour en incorporer une seule à l'endroit souhaité, généralement autour du site de fixation. Une étude sur l'homodimérisation de la lactose perméase de *E. coli* a été réalisée en utilisant deux réactifs de 5 et 21 Å et en mutant tour à tour en une cystéine unique chaque acide aminé des domaines extramembranaires de la protéine de transport [159].

Du fait du nombre important de peptides générés, il est nécessaire de pouvoir détecter facilement les peptides *liés* parmi les autres. Les conditions expérimentales doivent être optimisées pour obtenir un bon rendement de peptides *liés*, enrichir leur nombre avant analyse par purification, et/ou faciliter l'identification de ces peptides. Dans ce but, toute une batterie de réactifs et de méthodes est disponible [160].

La détection est aussi facilitée en utilisant des méthodes de spectrométrie de masse de plus en plus performantes comme la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et la FTICR, une technologie de masse exacte de très haute résolution et précision (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance). Une structure de basse résolution du complexe Fth–FtsY a été générée par modélisation moléculaire à partir de neuf peptides *inter liés* détectés par MS/MS. Ce modèle a ensuite été affiné par une minimisation d'énergie [161]. L'utilisation de réactifs de

« cross-linking » clivables permet de faciliter l'interprétation des spectres de MS/MS, car le séquençage se fait alors sur un peptide à la fois et non sur les deux en même temps. Les régions d'interaction entre la mellitine, un peptide, et la calmoduline ont été caractérisées par la FTICR [162].

La méthode de « cross-linking » présente plusieurs avantages. La quantité de protéine nécessaire pour la caractérisation des interactions protéiques est faible, de l'ordre de la femtomole dans les meilleures conditions. Elle permet en théorie d'étudier des complexes de toutes tailles, car ce sont les peptides issus de la digestion qui sont analysés. Cette méthode permet aussi, de façon plus aisée que la technique RMN ou de diffraction de rayons X, d'étudier les protéines membranaires, mais aussi les modifications post-traductionnelles. En figeant l'interaction, elle améliore aussi la détection des interactions faibles ou transitoires. Enfin, de nombreux réactifs chimiques, présentant des tailles et des spécificités de réactivité variées, sont disponibles commercialement pour mener les études de caractérisation de complexes dans des conditions expérimentales diverses [163].

ii. Méthodes de « footprinting »

Le concept de « footprinting » est basé sur la différence d'accessibilité au solvant des acides aminés de la protéine. Seuls les résidus en surface, accessibles, vont pouvoir être modifiés par des agents chimiques ou des enzymes spécifiques ou non de certains acides aminés. La zone d'interaction entre deux protéines peut être caractérisée en réalisant l'expérience de modification sur les protéines seules puis en complexe. L'accessibilité au solvant des résidus de la zone d'interaction diminue et du même coup une diminution de modification de ces résidus est observée. L'analyse se fait généralement par digestion enzymatique suivie d'une analyse par spectrométrie de masse pour identifier les peptides modifiés.

• « Footprinting » par modifications chimiques

Divers agents chimiques sont connus pour réagir sélectivement ou non avec les acides aminés. L'interaction entre l'arrestine et la rhodopsine phosphorylée a été caractérisée en acétylant les lysines accessibles et en utilisant l'échange isotopique $^1\text{H}/^2\text{H}$ couplé à la spectroscopie de masse [164]. L'utilisation d'un autre agent chimique, le tétranitrométhane qui modifie les tyrosines, a permis de caractériser l'interaction entre uPA et uPAR [165]. De nombreux réactifs capables de réagir de façon spécifique avec certains acides aminés sont

décrits dans la littérature. Si cette réactivité spécifique permet d'obtenir des informations ciblées, l'information obtenue reste partielle et l'utilisation d'agents de modifications aspécifiques permettrait de couvrir l'ensemble de la surface de la protéine.

La surface d'interaction entre la déoxy-hémoglobine et le 2,3-diphosphoglycérate a été caractérisée en utilisant une méthode de méthylation aspécifique par le bromure de méthyle. Afin de maintenir une structure native, les conditions ont été contrôlées pour limiter les modifications par protéine à une ou deux [166]. Une autre méthode nécessite d'incorporer dans les protéines des cystéines en lieu et place de certains acides aminés. Lors de l'interaction, seules les cystéines exposées et non protégées par la protéine partenaire vont être alkylées par un agent spécifique [167]. Cette méthode a le désavantage de nécessiter l'incorporation des cystéines qui risque de modifier la structure des protéines étudiées.

Une méthode récente utilisant un gaz photoactivable non spécifique, la diazirine, de taille comparable à l'eau, permet d'explorer les interfaces entre protéines (Figure I-20). Ce gaz génère des méthylène carbènes ($:CH_2$) extrêmement réactifs, qui réagissent instantanément et aspécifiquement sur n'importe quelle liaison de type X-H située dans leur environnement immédiat [168]. Actuellement, la diazirine marquée au 3H est utilisée pour localiser et quantifier les $:CH_2$ incorporés en réalisant des digestions enzymatiques, des séparations et quantifications par HPLC. Une méthode utilisant la détection et la quantification par spectrométrie de masse est actuellement en cours de développement pour éviter l'utilisation de produits radioactifs et diminuer les quantités de matière nécessaires.

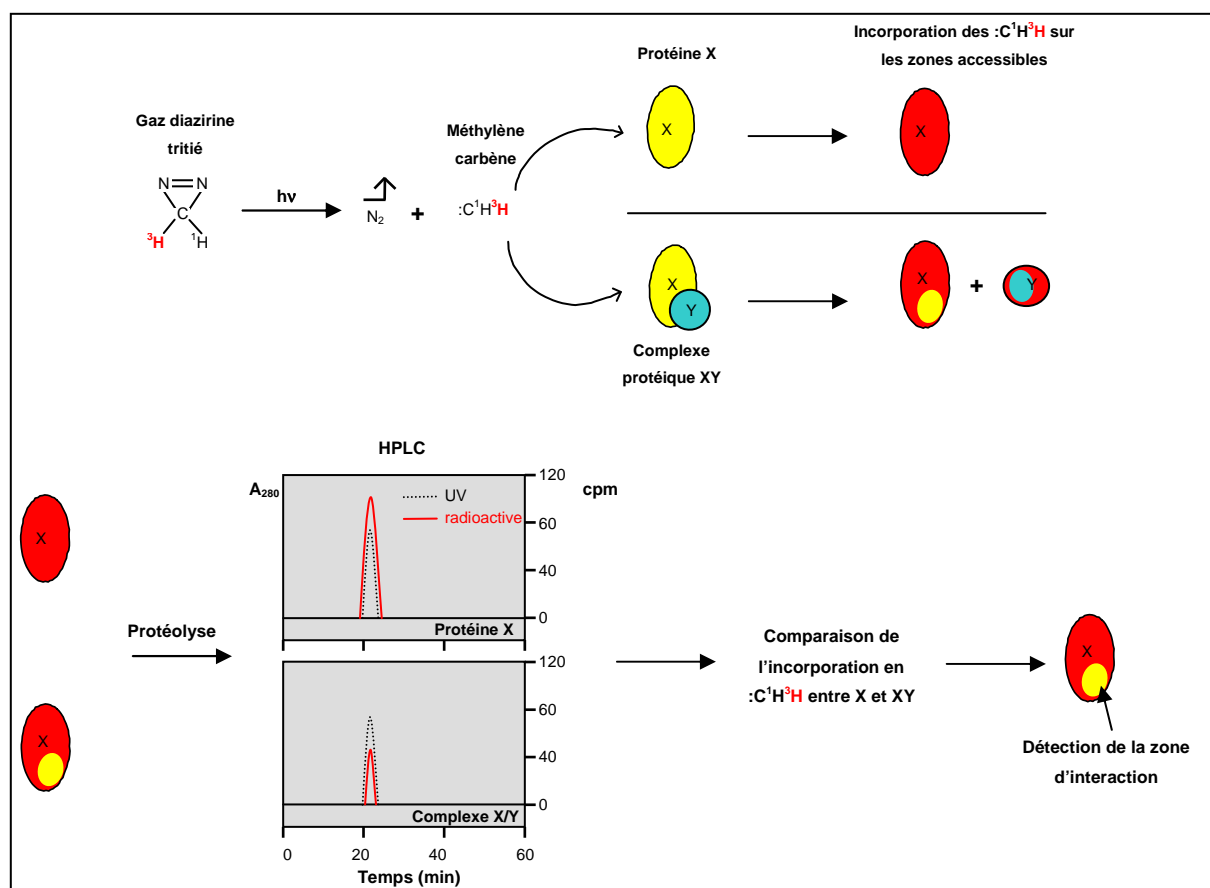


Figure I-20 Méthode de caractérisation des interfaces protéiques par la diazirine tritiée.

- « Footprinting » par clivages protéiques

Les zones d'interaction peuvent être caractérisées en utilisant des agents de clivage chimiques ou enzymatiques qui viennent couper la chaîne principale de la protéine aux endroits accessibles. C'est une approche similaire à celle utilisée pour le « footprinting » de l'ADN [169]. De manière générale, afin de pouvoir réaliser l'étude de « footprinting », la protéine est radiomarquée spécifiquement à l'une de ses extrémités avec un γ - ^{32}P Phosphore. Les protéines marquées seules ou en complexe avec un ligand sont clivées en parallèle par des agents de clivage de manière contrôlée. Les peptides générés sont alors analysés sur gel d'électrophorèse dénaturant puis par PhosphorImager. La protection de sites de coupure dans la zone d'interaction, induite par la présence d'un ligand, entraîne la diminution ou même la disparition de certains peptides normalement générés lors du clivage de la protéine seule. Ainsi, cette diminution ou disparition induit une variation de l'intensité d'émission γ liée à ces peptides. Ceci permet d'obtenir une lecture directe des sites de clivages et donc des acides aminés situés dans la zone d'interaction (Figure I-21) [170, 171].

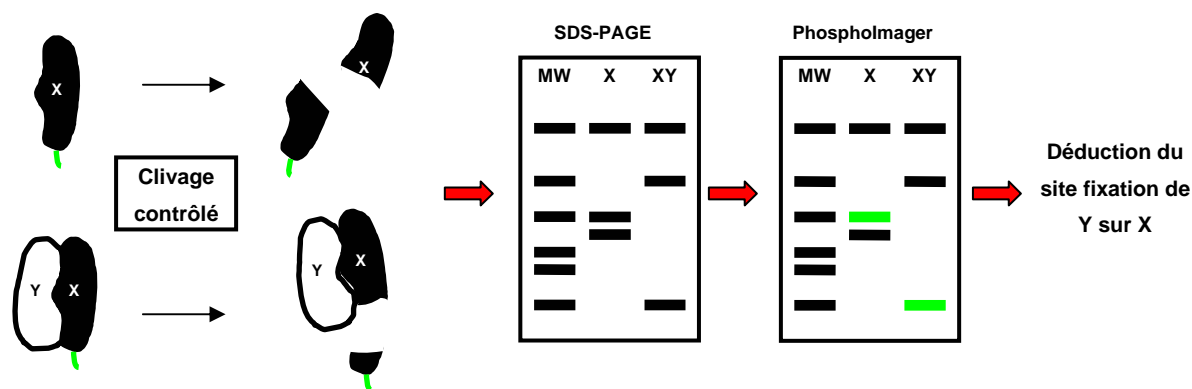


Figure I-21 Représentation schématique de la méthode de « footprinting » par clivage protéique.

Les agents de clivage peuvent être des enzymes, mais cette approche n'est pas la mieux adaptée pour obtenir une bonne résolution [172, 173]. En effet, la spécificité des protéases limite le nombre de sites de coupure et le rendement de protéolyse peut varier énormément selon les séquences et structures des protéines.

Les radicaux hydroxyle (HO^\bullet), un autre type d'agent de clivage, présentent l'avantage d'être applicables théoriquement à toutes les protéines puisqu'ils les clivent de manière non spécifique. Ces radicaux peuvent être produits par un complexe Fe-EDTA en présence de peroxyde d'hydrogène et d'ascorbate de sodium [174]. Les conditions sont optimisées pour produire principalement une seule coupure par protéine (moins de 1% de multiples coupures) pour éviter des clivages secondaires sur les peptides obtenus. Les conditions utilisées favorisent les coupures de la chaîne principale et minimisent les modifications des chaînes latérales qui pourraient considérablement compliquer l'analyse du gel d'électrophorèse. De plus, il semblerait que les clivages ne soient pas dépendants de la séquence en acides aminés mais principalement de l'accessibilité des résidus et donc de la structure de la protéine [171]. Toutefois cette méthode présente quelques désavantages. Du fait de l'analyse sur gel SDS-PAGE, la résolution est limitée à l'identification de peptides de 4 ou 5 résidus de différences au maximum, et ce avec une calibration précise. De plus, les petits peptides de moins de 40 acides aminés et les peptides de plus de 90% de la taille entière de la protéine ne sont pas facilement analysables, car les premiers sont mal résolus ou perdus et les seconds se confondent avec le large spot de la protéine non clivée. Enfin, une attention particulière doit être apportée lors de l'interprétation des données car une modification de structure peut entraîner une variation locale de la sensibilité à la coupure sans que la zone impliquée soit en

interaction. Cette méthode a été appliquée avec succès pour la caractérisation de la zone d'interaction entre la sous-unité α et les sous-unités β et β' de l'ARN polymérase [175].

Lorsque les protéines (> 100 kDa) ou les complexes à étudier sont trop volumineux, la surface d'accessibilité est élevée et le nombre de produits de la digestion devient trop important pour être facilement analysable et interprétable par SDS-PAGE. Une évolution intéressante de cette méthode permet de cliver localement les protéines (Figure I-22) [176]. Préalablement, la protéine est modifiée par biologie moléculaire pour obtenir une cystéine unique à l'endroit désiré. Un agent de clivage, le (*S*)-1-(p-bromoacétamidobenzyl) EDTA (FeBABE) possédant un centre de Fe-EDTA, est alors fixé sur la protéine par l'intermédiaire de cet acide aminé. Différents variants sont ainsi constitués en introduisant par exemple par mutation une cystéine autour de la zone d'interaction supputée. L'agent FeBABE peut aussi être fixé par l'intermédiaire d'un espaceur sur les lysines qui sont souvent idéalement réparties sur la surface permettant une couverture quasi-totale de cette dernière. Les conditions sont choisies pour qu'en moyenne il n'y ait qu'un ou deux FeBABE par molécule de protéine pour préserver son activité biologique. Cette méthode permet un criblage efficace de l'interface entre protéines, et l'utilisation des cystéines uniques, une meilleure résolution. Typiquement, la concentration en radicaux hydroxyle générés diminue avec l'éloignement du centre et peut cliver jusqu'à 40 Å du centre. Cette technique utilisant cette protéase artificielle a permis de caractériser le site d'interaction de la sous-unité σ avec l'ARN polymérase [176] et d'identifier la zone d'interaction entre le facteur de transcription TFIIB et l'ARN polymérase II [177].

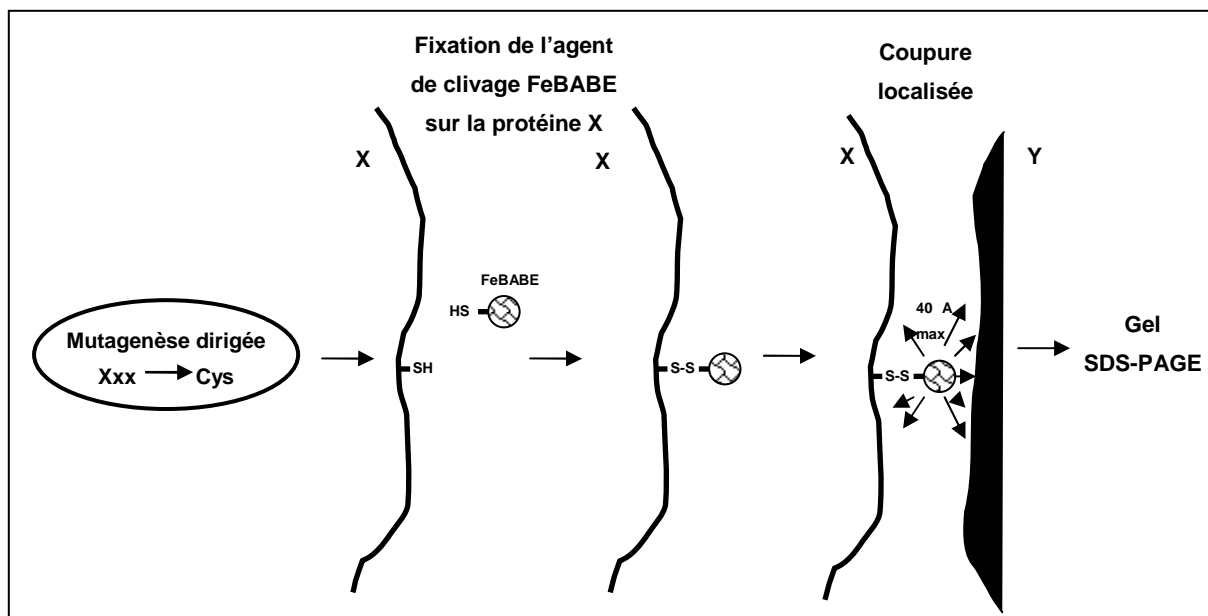


Figure I-22 Représentation schématique de coupure chimique localisée avec la stratégie FeBABE.

Malgré ces avancées, l'utilisation de radicaux hydroxyle pour cliver les protéines n'est pas toujours efficace et l'analyse sur gel d'électrophorèse dénaturant ne permet pas d'avoir une bonne résolution. Cette méthode en cours d'amélioration pourrait devenir plus intéressante si elle était couplée à la détection par spectrométrie de masse.

- « **Footprinting** » par oxydation des protéines

Une autre approche utilise cette fois-ci la capacité d'oxydation des chaînes latérales des protéines par les radicaux hydroxyle plutôt que leur capacité de coupure. Le principe général de la méthode est représenté sur la Figure I-23. La protéine seule ou en complexe est soumise à l'attaque des radicaux hydroxyle qui oxydent les chaînes latérales des acides aminés réactives et accessibles aux solvants. Une protéolyse enzymatique est réalisée et les peptides obtenus, oxydés ou non, sont séparés, identifiés et quantifiés par LC-MS. Les acides aminés oxydés sont alors mis en évidence par spectrométrie de masse en tandem. Cette méthode permet de définir les structures de protéines, l'assemblage de complexes et les changements de conformation de protéines [178].

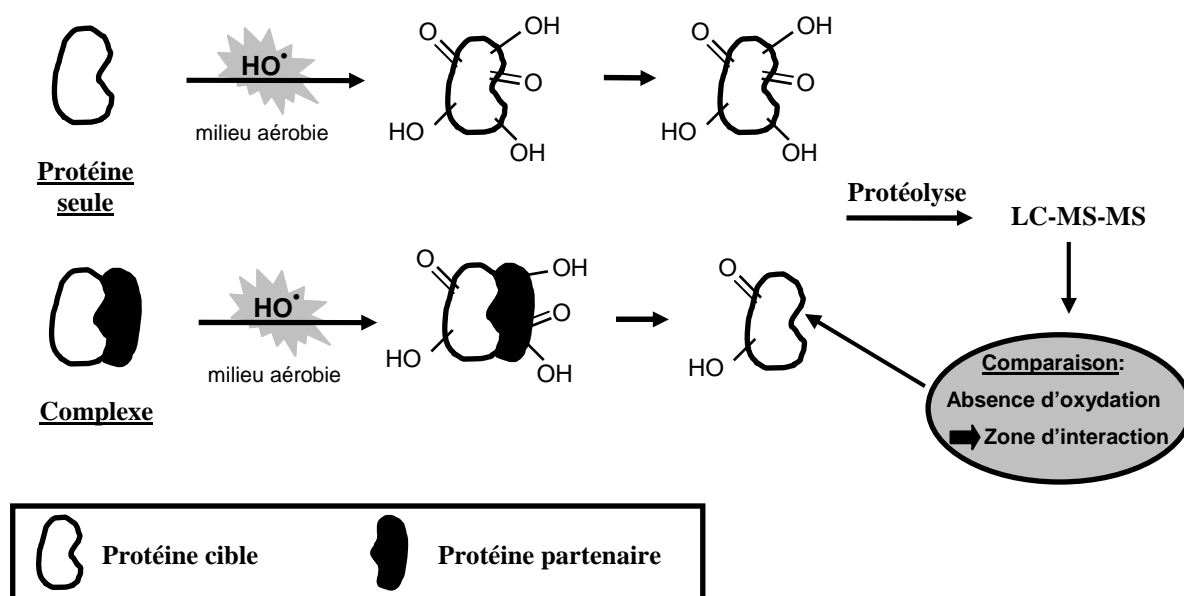


Figure I-23 Représentation schématique de la méthode d'oxydation de protéines couplée à la spectrométrie de masse pour la caractérisation des interactions protéine-protéine.

Les radicaux hydroxyle peuvent être produits par la réaction de Fenton, par la photo oxydation du peroxyde d'hydrogène par irradiation UV, mais également par radiolyse de l'eau en utilisant de radiations ionisantes comme les rayons X, γ , β ou les neutrons rapides ou en produisant une décharge électrique. [179-184].

Plusieurs exemples montrent que cette méthode est applicable à la caractérisation des interactions protéine-protéine. Le domaine de liaison entre la transferrine C-lobe et son récepteur et les complexes calmoduline-mélatine et gelsoline-actine ont ainsi été caractérisés [178, 183].

Cette méthode présente plusieurs avantages. Elle permet d'étudier des complexes multi-protéiques en solution simultanément avec une détection par la masse, de l'ordre de la femtomole à la picomole. Elle peut théoriquement analyser toutes les tailles de complexes. Elle a notamment permis d'étudier un complexe de 330 kDa [183]. Quatorze des acides aminés sur les vingt sont utilisables comme marqueurs d'accessibilité lors des expériences de footprinting, soit environ 65 % de la séquence d'une protéine type [184]. Cette méthode permet donc d'avoir une très bonne couverture de l'accessibilité de surface des résidus et représente une bonne alternative pour caractériser les interactions protéine-protéine [178]. Cette technique, couplée à de la modélisation, peut permettre d'affiner une structure ou

d'apporter des contraintes tirées de l'accessibilité au solvant. Elle pourrait dans un avenir proche permettre de suivre une interaction de façon résolue en temps puisque des irradiations de l'ordre de la milliseconde peuvent être obtenues par laser UV ou synchrotron. Une perspective intéressante de cette méthode basée sur deux méthodes d'oxydations ou de clivages localisés par les radicaux hydroxyle (Figure I-22) pourrait permettre d'obtenir des informations de distances intra- ou intermoléculaires avec le développement d'une méthode de calibration « oxydation–distance » appropriée [176, 178, 185].

- **Echange H / ^2H des hydrogènes des amides de la chaîne principale**

La surface d'interaction entre deux protéines peut être caractérisée en utilisant le phénomène d'échange entre l'hydrogène (^1H) d'un amide de la chaîne principale d'une protéine et un deutérium (^2H) de l'eau. La cinétique d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$, variable selon la localisation de l'amide, est rapide en surface (de la seconde à la minute) et plus longue quand l'amide est enfoui dans le cœur de la protéine ou en contact avec un ligand. Ainsi, cette méthode permet de suivre des changements de conformation, les phénomènes de repliement et de formation de complexes. Deux méthodologies complémentaires peuvent être utilisées (Figure I-24). La première appelée « On-exchange » consiste à marquer en parallèle la protéine seule ou en complexe par un simple échange des hydrogènes dans l'eau deutérée. Seuls les amides enfouis et les amides de surface protégés lors de l'interaction présenteront encore des hydrogènes. Le deuxième protocole « Off-exchange » consiste à marquer par échange dans l'eau lourde les deux protéines partenaires individuellement afin que l'ensemble de leur surface soit deutéré. Les deux protéines sont alors mises en contact pour former le complexe et celui-ci est remis dans de l'eau H_2O pour échanger de nouveau les deutériums des amides restés accessibles. Cette fois-ci, l'empreinte contraire est obtenue avec des deutériums uniquement dans la zone protégée de l'interaction. Pour ces deux types d'expériences, les résultats sont comparés avec ceux obtenus en parallèle sur les protéines seules, pour indiquer la zone d'interaction. Un inconvénient majeur est le risque de rééchanger au cours du temps le nouvel isotope juste fixé sur l'amide. La réaction d'échange est donc stoppée dans une solution acide à pH 2,5 à 0 °C, puis l'échantillon est digéré avec la pepsine en quelques minutes, une enzyme non spécifique mais active dans ces conditions. L'identification des peptides est réalisée par séquençage et analyse par spectrométrie de masse, soit en combinant un séquençage biochimique et le MALDI-TOF, soit par LC-MS-MS [186, 187].

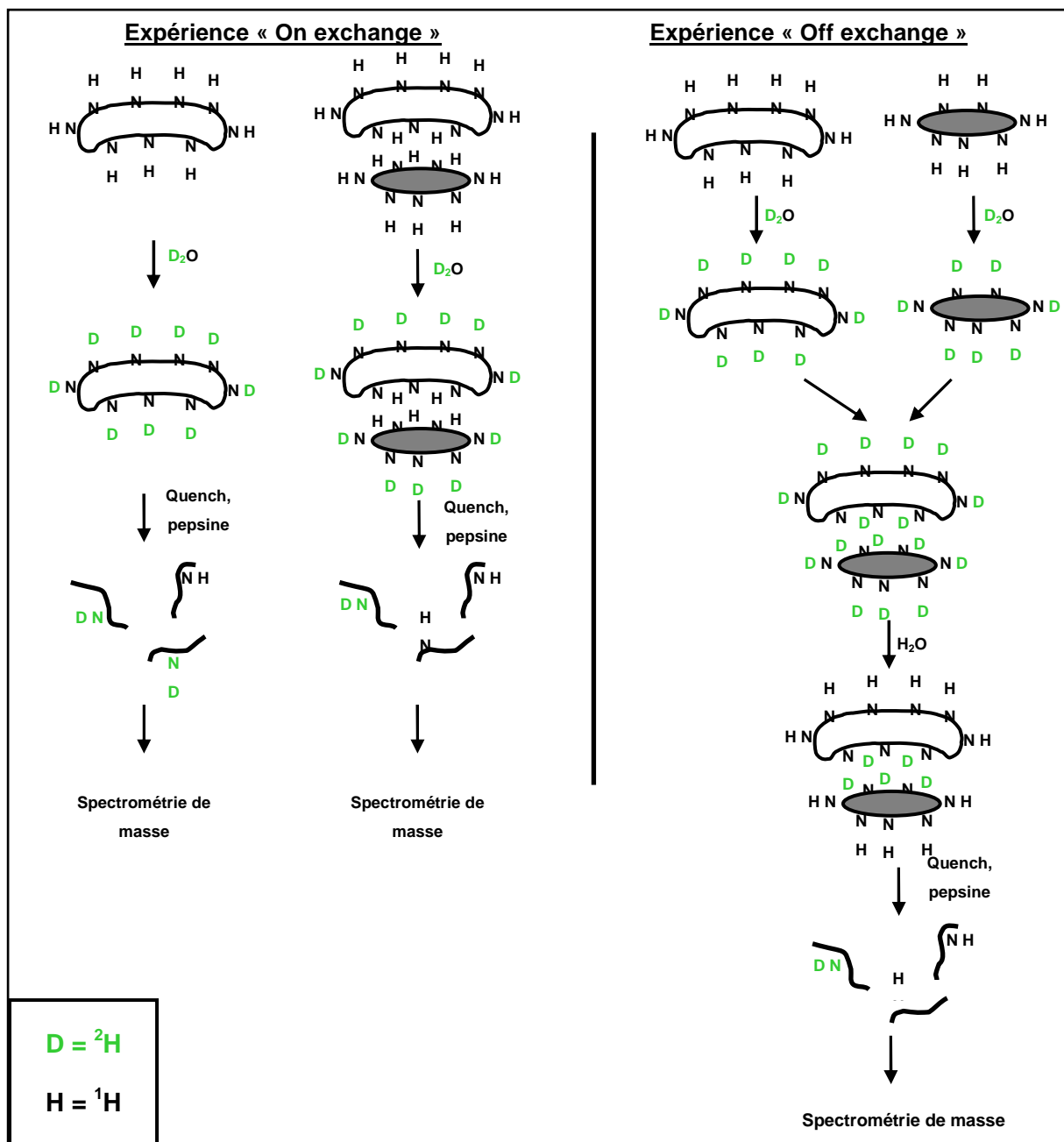


Figure I-24 Représentation schématique de la méthode d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$.

Cette méthode a été beaucoup utilisée ces dernières années pour caractériser les complexes ou suivre les changements de conformation. Par exemple, la méthode a permis de montrer que la protéine MPK3 interagit au niveau de deux sites de la protéine ERK2 [187]. Une autre étude montre la zone d'interaction entre deux sous-unités de la protéine kinase A [188]. Ces deux études se sont appuyées sur des structures connues de RX ou RMN et sur l'utilisation de programmes de modélisation moléculaire pour générer et affiner les interfaces.

Elle présente plusieurs avantages. L'hydrogène est échangé contre le deutérium, un isotope qui présente des propriétés physiques et chimiques quasi équivalentes. De plus, les sites labiles sont répartis tout le long de la chaîne principale car il s'agit des amides des liaisons peptidiques. Enfin, cette méthode est rapide et permet d'analyser de très gros complexes [189].

Le principal défaut de cette méthode est le risque que l'amide ait le temps de rééchanger l'isotope fixé. Quand le complexe a une constante d'affinité faible (> 10 nM), il est nécessaire de mettre en excès l'un des deux partenaires pour éviter ce phénomène. De même, la réaction d'échange doit être stoppée rapidement en milieu acide au pH de 2,5 et à 0 °C pour ensuite être digérée. Des échanges sont aussi observés lors de l'analyse par spectrométrie de masse. Par exemple, 46 % d'échange a été estimé lors d'une étude par MALDI-TOF, nécessitant alors une correction ultérieure sur l'incorporation réelle [188].

I.B.3 La Modélisation Moléculaire

Devant parfois de grandes difficultés ou devant l'impossibilité d'étudier certains complexes, trop volumineux, présentant des interactions faibles ou transitoires, ou encore de natures hydrophobes comme les complexes membranaires, une alternative plus rapide aux méthodes expérimentales est la modélisation moléculaire ou « docking ». Ce processus consiste à modéliser une structure tridimensionnelle d'un complexe, et plus généralement son interface, à partir des structures connues de ses constituants. Cette modélisation peut se faire *ab initio*, c'est à dire sans données complémentaires, mais actuellement, les méthodes qui donnent les meilleurs résultats sont celles qui utilisent des données expérimentales biochimiques et/ou biophysiques sur la zone d'interaction [190]. Le niveau et la qualité des détails obtenus, dépendant du type de techniques expérimentales, vont peser sur la capacité des méthodes de modélisation à obtenir une bonne résolution du complexe étudié. L'utilisation de données de conservation de structure entre les espèces peut aussi servir pour caractériser les résidus des zones d'interactions.

Une expérience de modélisation moléculaire nécessite deux étapes : les méthodes de « sampling » permettent de générer des structures du complexe ; les méthodes de « scoring » identifient parmi les structures celles qui sont en bon accord avec les filtres utilisés. Les structures en faible accord sont écartées. Durant la modélisation moléculaire, divers degrés de

flexibilité peuvent être introduits augmentant la qualité des structures obtenues mais aussi le temps de calcul. Ainsi, lors de la modélisation, des méthodes peuvent maintenir les structures des protéines du complexe rigides, autoriser certains chevauchements, ou introduire de la flexibilité dans les chaînes principales et/ou latérales des protéines. Les données expérimentales peuvent être introduites dès l'étape de « sampling », ou lors de l'étape de « scoring » pour améliorer le tri des solutions correctes en comparaison avec la modélisation *ab initio* [190]. L'incorporation des données expérimentales dès la première étape de modélisation permet pour sa part de réduire l'espace de recherche et ainsi d'enrichir le nombre de configurations correctes ou proches de l'être. L'utilisation de données expérimentales dans les deux étapes permet de réduire le champ d'investigation et donc de gagner du temps. En moyenne, le nombre de configurations possibles entre deux protéines peut atteindre 10^7 . Ce chiffre augmente proportionnellement avec la taille du complexe et quand de la flexibilité est permise [191].

Il existe différents programmes de modélisation moléculaire (HADDOCK, RosettaDock, ICM-DISCO,...) plus ou moins performants selon les types de complexes analysés [190-193]. Aucune de ces méthodes ne permet actuellement de donner les bonnes structures pour l'ensemble des complexes existants. Pour évaluer leur performance, un concours de prédiction à l'aveugle CAPRI (Critical Assessment of PRedicted Interactions) permet aux concurrents en quelques semaines de tester leurs méthodes sur de récentes structures de complexes de hautes résolutions non publiées [194]. Les structures obtenues sont maintenant, quand les conditions sont réunies, d'une précision de niveau atomique [193].

Devant l'impossibilité actuelle d'obtenir des structures de complexes de haute résolution pour toutes les protéines avec les méthodes de RMN et de cristallographie de rayons X, la caractérisation des interfaces protéine-protéine par des méthodes de plus basse résolution couplées ensuite avec des étapes de modélisation moléculaire est une approche incontournable. Toutefois, toutes ces méthodes présentent des limitations. L'ensemble des avantages et inconvénients est résumé dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** La plupart des méthodes, « cross-linking », oxydation des protéines, mutagenèse dirigée, « site directed labelling », incorporent des modifications sur les protéines pour pouvoir analyser les interactions. Ces modifications de structure peuvent entraîner des changements de conformations et ainsi fausser les résultats. La méthode d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ est intéressante car

l'incorporation d'un deutérium sur les liaisons amides n'entraîne pas de modification de la structure chimique de la protéine. Par contre, cette technique ne donne des informations que sur la chaîne principale de la protéine et l'incorporation en deutérium sur ces liaisons labiles ne facilite pas l'analyse par spectrométrie de masse.

La méthode que nous souhaitons développer s'appuie sur ce concept d'échange isotopique mais afin d'avoir une méthode de détection plus sensible nous avons choisi le tritium à la place du deutérium. De même, afin de nous affranchir des problèmes de « back-exchange » rencontrés lors de l'échange sur les amides (N–H), nous avons choisi de réaliser cet échange sur des positions non labiles : des liaisons carbone–hydrogène (C–H). Enfin, afin d'avoir une couverture aussi complète que possible des zones d'interaction, toute la surface des protéines étudiées devra être le siège de cet échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ et, en particulier, les chaînes latérales des acides aminés.

Techniques	Préparation échantillon	Avantages	Inconvénients
RX	<ul style="list-style-type: none"> - cristaux - monodisperse - 5 à 10 mg 	<ul style="list-style-type: none"> - très haute résolution atomique (1 Å) 	<ul style="list-style-type: none"> - cristaux requis - parties flexibles ne sont pas cristallisables - structure peut être influencée par le cristal - quantité de protéine (plusieurs mg)
RMN	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - marquage ^{15}N, ^{13}C, deutération - 5 à 10 mg.ml⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - haute résolution atomique (2-3 Å) - dynamique - suivi de changement de conformation 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficilement applicable pour des masses >50 kDa - quantité de protéine (plusieurs mg)
Cryo-ME	<ul style="list-style-type: none"> - congelé - < 1 mg.ml⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - applicable grosses structures > 200 kDa - faible quantité de protéine - visualisation directe de la forme et de la symétrie - différentes conformations 	<ul style="list-style-type: none"> - difficilement applicable aux petites structures < 200 kDa - faible résolution (10 Å) (pseudo-atomique couplée avec la RX)
SAXS/SANS	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - 1 à 100 mg.ml⁻¹ 	<ul style="list-style-type: none"> - analyse des structures, cinétiques et interactions dans des conditions quasi-natives en temps réel - étude de mélanges - quelques kDa à des centaines de MDa 	<ul style="list-style-type: none"> - faible résolution (10 à 30 Å) - nécessite des informations complémentaires pour résoudre les structures
SDSL/RPE	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - mutagenèse - incorporation d'un marqueur avec un spin électronique 	<ul style="list-style-type: none"> - données d'orientation, de dynamique, de position, d'accessibilité et de distance - protéines membranaires et solubles 	<ul style="list-style-type: none"> - mutation et marqueur chimique : risque de modification de structure - caractérisation localisée d'interaction

« Alanine scanning »	<ul style="list-style-type: none"> - sur support solide + « phage display » - mutagenèse 	<ul style="list-style-type: none"> - rapide (moins de 1 mois) - détermination du rôle de l'acide aminé dans l'interaction - pas de purification 	<ul style="list-style-type: none"> - mutation : risque de modification de structure
« Cross-linking »	<ul style="list-style-type: none"> - en solution, dans les cellules - réaction des acides aminés réactifs avec un « cross linker » 	<ul style="list-style-type: none"> - en théorie : taille illimitée - très bonne détection par SM (femto à picomoles) - informations de distances intra et intermoléculaires - protéines membranaires et modifications post-traductionnelles - interaction faible ou transitoire détectée 	<ul style="list-style-type: none"> - basse résolution obtenue avec modélisation moléculaire - « cross-link » : risque de modification de structure - nécessité d'acide aminé réactif en surface (sinon mutagenèse)
« Footprinting » par le Bromure de méthyle	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - modification par le BrMe 	<ul style="list-style-type: none"> - aspécifique (bonne couverture de surface théorique) - accessibilité 	<ul style="list-style-type: none"> - modification chimique : risque de modification de structure
« Footprinting » par la diazirine	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - gaz diazirine très réactif sur tout X-H 	<ul style="list-style-type: none"> - aspécifique et très réactif - accessibilité 	<ul style="list-style-type: none"> - modification chimique : risque de modification de structure
« Footprinting » par clivage par les HO [•]	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - coupure par les HO[•] 	<ul style="list-style-type: none"> - aspécifique - petits complexes 	<ul style="list-style-type: none"> - rendement moyen de coupure - risque de coupure secondaire sur les peptides résultants - analyse par SDS-PAGE : résolution moyenne
« Footprinting » par clivage localisé par les HO [•]	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - mutagenèse en cystéine (si nécessaire) 	<ul style="list-style-type: none"> - aspécifique - petits et gros complexes 	<ul style="list-style-type: none"> - analyse par SDS-PAGE : résolution moyenne - modification chimique : risque de modification de structure
« Footprinting » par oxydation par les HO [•]	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - oxydation par les HO[•] en milieu aérobie 	<ul style="list-style-type: none"> - en théorie : taille illimitée - résolution résidu acide aminé - analyse de complexe multi-protéique possible - accessibilité, changement de conformation, assemblage de complexe - très bonne détection par SM (femto à picomoles) 	<ul style="list-style-type: none"> - 65 % de couverture de surface (accessibilité) - oxydation : risque de modification de structure
Echange ¹ H/ ² H	<ul style="list-style-type: none"> - en solution - échange ¹H/²H sur les H des amides 	<ul style="list-style-type: none"> - en théorie : taille illimitée - rapide - aucune modification de structure - 100 % de couverture de surface (accessibilité) - suivi des changements de conformations, repliement, formation de complexe 	<ul style="list-style-type: none"> - « Back exchange » ¹H/²H - résolution au niveau du peptide (zone d'interaction) - information au niveau de la chaîne principale

Tableau I-1Avantages et inconvénients des méthodes permettant la résolution de structures de complexes protéiques et/ou la caractérisation des interactions protéine–protéine.

II Détection et quantification des sites d'attaque des radicaux hydroxyle sur les protéines

Notre méthode de caractérisation des interactions protéine–protéine est basée sur l'accessibilité des acides aminés des protéines vis-à-vis des molécules d'eau. Après une étape de radiolyse de l'eau, les radicaux hydroxyle, générés à proximité de ces acides aminés, réagissent avec ces derniers conduisant à la formation de radicaux par arrachement d'un hydrogène. Ces radicaux sont alors quantifiés grâce à un marqueur radioactif, le tritium. Le principe de notre approche est basé sur l'identification et la quantification de radicaux sur les protéines.

Notre méthode a donc le potentiel de caractériser les interactions protéine–protéine, de réaliser de la cartographie de surface, mais également de servir à éclaircir la formation, la localisation, la délocalisation et la propagation des radicaux sur les protéines. Ces phénomènes radicalaires peuvent se produire de manière normale dans la cellule, dans des mécanismes enzymatiques, mais aussi lors d'événements tels le stress oxydant [195-198]. Malgré l'importance d'identifier et de quantifier les sites de réactions des radicaux (notamment des radicaux hydroxyle) sur les protéines, peu de méthodes sont disponibles. Il existe des techniques indirectes qui suivent l'apparition de produits de réaction avec les radicaux, observables par spectroscopie d'absorption ou de fluorescence [199]. Cependant, la technique principale est la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) [200, 201]

La RPE est spécifique des radicaux et permet de localiser le radical sur un type de structure donnée. Toutefois, cette méthode ne peut à elle seule différencier si le radical est par exemple sur telle ou telle tyrosine d'une séquence protéique. De plus, si l'observation directe des radicaux formés sur les protéines par la technique RPE est possible, leur très faible concentration et leur instabilité rendent ces observations difficiles. Toutefois, ces radicaux peuvent être détectés indirectement par RPE en convertissant ces radicaux primaires en des radicaux à plus longue durée de vie, en créant des adduits avec des molécules paramagnétiques radicalaires plus stables, les « spin trap ». Cependant, cette méthode de « spin-trapping » peut fournir des résultats erronés en interprétant un adduit comme étant le site d'un radical primaire, alors que dans certains cas, ce même adduit peut être obtenu par exemple par oxydation du « spin trap » réagissant ensuite sur un acide aminé non radicalaire. Ces problèmes chimiques couplés à la difficulté inhérente d'interprétation des spectres RPE, peuvent empêcher l'identification non ambiguë des sites radicalaires sur les protéines [202].

Afin de résoudre les limitations liées à la RPE, la spectrométrie de masse est aussi utilisée pour détecter des adduits non radicalaires obtenus à partir de « spin trap » diamagnétiques. La sensibilité de la détection est dès lors améliorée en passant du nanomolaire pour la RPE au picomolaire, voire moins, pour la spectrométrie de masse. Toutefois, les problèmes chimiques liés aux « spin trap » sont toujours présents et la réactivité moyenne des radicaux sur ces « spin trap » (10^6 - $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) nécessite toujours l'utilisation de 100 à 1000 équivalents de « spin trap » [203]. Récemment, une molécule radicalaire stable, le TEMPO^{*}, hautement réactive avec les radicaux carbo-centrés ($5,10^7$ à $2,10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), a permis de créer un adduit stable non radicalaire détectable par spectrométrie de masse. Cette méthode de « spin scavenging » présente le triple avantage, par rapport au « spin trapping », de pouvoir détecter plus de radicaux par un meilleur rendement d'adduit, d'être moins sensible aux réactions radicalaires secondaires et enfin d'être spécifique à l'étude de radicaux carbo-centrés [202].

Deux méthodes alternatives à la RPE sont basées sur la détection des sites d'attaque des radicaux hydroxyle. La première utilise la réparation des radicaux carbo-centrés par des donneurs d'hydrogène en travaillant en milieu anaérobie. Ceci permet d'introduire un isotope stable (^2H) sur les chaînes latérales des acides aminés, détectable par RMN du deutérium (RMN ^2H) ou par spectrométrie de masse [204-206]. Toutefois, à ce jour, cette approche élégante n'a été appliquée qu'aux acides aminés et aux petits peptides, ce qui est en partie dû à la faible sensibilité apportée par le ^2H . La seconde est basée sur l'analyse par spectrométrie de masse des produits d'oxydations (hydroxylation, ...) des radicaux de protéines générés en présence de radicaux hydroxyle et de dioxygène [178]. Ces phénomènes d'oxydation très courants sur les protéines en milieu aérobie sont également utilisés pour cartographier la surface des protéines [184].

Dans ce chapitre, nous décrivons une méthode alternative d'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ qui permet la détection des sites d'attaques des radicaux hydroxyle sur les protéines. Dans un premier temps, les origines de la méthode et les travaux préliminaires du laboratoire seront exposés. Puis, une échelle de réactivité de vingt acides aminés vis-à-vis des radicaux hydroxyle et de notre donneur d'atomes de tritium sera présentée. Enfin, notre méthode de détection de radicaux sera testée et validée sur de petits peptides.

II.A Les origines de la méthode

II.A.1 Historique des méthodes de détection de radicaux par marquage au tritium

Ce paragraphe introductif traite de deux approches, datant des années 70, utilisant l'atome de tritium comme moyen de détection des radicaux sur les protéines. Ces méthodes permettent d'incorporer en surface, de manière stable sur des liaisons C–H, cet isotope de l'hydrogène. L'une d'entre elles est notamment utilisée pour cartographier les surfaces protéiques.

La première approche permet uniquement de détecter des radicaux formés sur les acides aminés aromatiques des protéines (Tyr, Phe, His) et principalement sur le tryptophane (Trp) [207]. L'incorporation de tritium est obtenue en générant par photolyse des espèces radicalaires, formées suite à la rupture homolytique des liaisons C–H, N–H, O–H et S–H, qui réagissent alors avec l'eau tritiée en arrachant un tritium. Seuls les radicaux carbo-centrés (C[•]) permettent d'incorporer de manière stable un ³H en formant une liaison C–³H. Cette réaction, menée en milieu aérobie ou anaérobie, présente cependant une meilleure incorporation de tritium en absence d'oxygène. En raison de la sélectivité de marquage sur les seules positions aromatiques, cette approche est peu efficace et n'a pas donné suite à de nouvelles expériences.

La seconde approche, développée par Shishkov et Baratova [208-210], consiste aussi à introduire sur une protéine un tritium comme marqueur radioactif. La protéine est rapidement congelée dans l'azote liquide à 77 K en la projetant par spray sur la surface du réacteur en verre. Le gaz tritium ³H₂ est atomisé par catalyse thermique en contact avec un filament de tungstène chauffé à 2000 K. La protéine congelée est alors bombardée sous vide avec un faisceau d'atomes de ³H chauds, ce qui permet un mécanisme de substitution directe ¹H/³H, passant transitoirement par un radical C[•] au niveau des chaînes latérales des acides aminés situés à la surface de la protéine (Figure II-1). Les auteurs indiquent que la réaction se produit dès le premier contact du ³H[•] avec les liaisons C–H de surface avec une pénétration maximale de 3 à 5 Å.

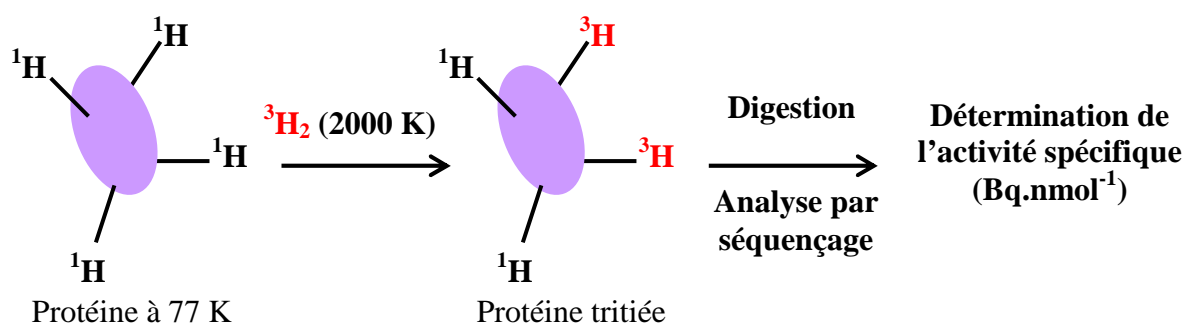


Figure II-1 La planigraphie par incorporation de tritium.

L'analyse par séquençage automatisé de la protéine permet de séparer les acides aminés un à un puis de les collecter. Le calcul de l'*activité spécifique*⁴ (Bq.nmol⁻¹) permet de déterminer les acides aminés les plus exposés. Ainsi, les acides aminés se trouvant à la surface de la protéine ont une activité spécifique plus élevée, donc une incorporation de tritium plus importante, que ceux se trouvant enfouis. Cette méthode a été appliquée à la caractérisation de surface de diverses protéines [211-214]. La non-sélectivité de la méthode permet de marquer l'ensemble des liaisons de type C–H situées en surface. Le spectre d'application de cette méthode est donc assez large car pratiquement toutes les molécules biologiques présentent des fonctions de type C–H. De plus, l'atome de tritium, de par sa petite taille, est une très bonne sonde de surface en permettant d'obtenir un bon niveau de discrimination structurale. Néanmoins, ces travaux présentent des contraintes. Cette méthode requiert un appareillage très lourd avec notamment l'utilisation d'ampoule de gaz tritium de plusieurs centaines de GBq et ainsi toute une installation de radioprotection appropriée. De plus, bien que l'intégrité chimique de la protéine soit préservée lors de l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$, la congélation de la protéine peut provoquer potentiellement sa dénaturation.

Mises à part ces difficultés, cette approche montre le potentiel du tritium comme indicateur de radicaux de surface et comme marqueur de surface protéique. En effet, l'utilisation de l'isotope radioactif de l'hydrogène permet, sans introduire de modification physique ou chimique de la structure, une détection sensible des résidus marqués en surface. Récemment, une approche conceptuellement intéressante a été utilisée pour la détection de radicaux sur des acides aminés et des petits peptides, à l'aide de deutérium.

⁴ **Activité spécifique (Bq.nmol⁻¹) :** nombre de désintégrations par seconde (Bq) et par mole d'un composé marqué.

II.A.2 Echange $^1\text{H}/^2\text{H}$ en présence de HO^\bullet et d'un donneur de ^2H

Ces travaux, basés sur l'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$, utilise les radicaux hydroxyle produits par radiolyse de l'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$) et un agent de réparation donneur de deutérium, le dithiothréitol (DTT) [204-206]. Cette technique conjugue les avantages de deux méthodes décrites précédemment : l'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ couplé à la spectrométrie de masse et le « footprinting par oxydation » des protéines par les HO^\bullet . Tout comme la première, elle permet l'introduction d'un isotope de l'hydrogène n'induisant aucune modification de la structure des acides aminés et donc des protéines. Elle prend ensuite avantage de la seconde méthode en utilisant la très grande réactivité et la non sélectivité des HO^\bullet sur les liaisons C–H pour former des radicaux carbo-centrés (C^\bullet). En milieu anaérobie, l'introduction de deutérium par un vecteur soufré (DTT) permet la reconstitution de liaisons C- ^2H non labiles.

Le mécanisme de la réparation de la leucine et de la régénération de l'agent de réparation (DTT) dans $^2\text{H}_2\text{O}$, proposé par Anderson et ses collaborateurs, est détaillé dans la Figure II-2. Suite à la réparation, l'acide aminé deutéré de manière stable sur une liaison C- ^2H et la forme radical thiyl du DTT sont obtenus. Ce radical thiyl forme ensuite sur lui même un cycle à six chaînons, stable sous forme d'anion radicalaire dissulfure. Ce phénomène présente l'avantage d'auto-neutraliser le radical thiyl pour qu'il n'ait pas le temps de réagir sur les biomolécules avoisinantes. La forme anion radicalaire du DTT dissulfure se dismute ensuite en la forme oxydée et réduite du DTT, permettant ainsi de régénérer dans l'eau deutérée la forme donneuse de deutérium. Le DTT a aussi l'avantage de posséder une constante de vitesse de réparation des C^\bullet de $10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$, soit seulement un ordre de grandeur de moins que la vitesse d'arrachement des hydrogènes des liaisons C–H par les radicaux hydroxyle [206].

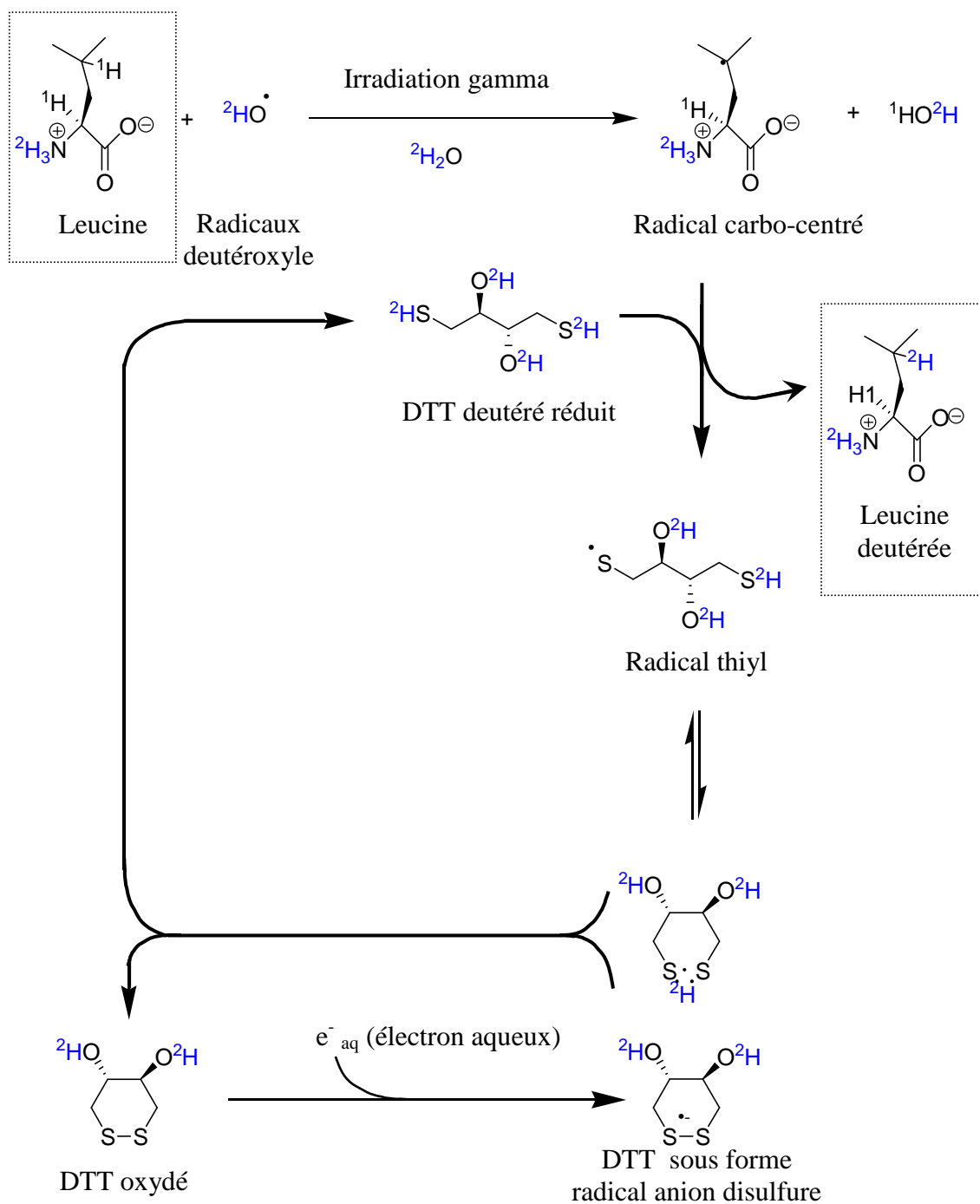


Figure II-2 Echange $^1\text{H}/^2\text{H}$ sur la leucine induit par les radicaux hydroxyle et le DTT.

La détermination de l'incorporation en ^2H , dans les acides aminés ou les peptides, est faite par spectrométrie de masse mais également par RMN du deutérium [205, 206].

Cette méthode a permis de détecter les radicaux carbo-centrés formés sur les acides aminés mais aussi sur de petits peptides. Les résultats obtenus ont permis de tracer une échelle relative de réactivité des acides aminés vis-à-vis des radicaux hydroxyle et du DTT.

Leu>Ile>Val>Arg>Lys>Tyr>Pro>His>Phe>Met>Thr>Ala>[Glu, Ser, Asp, Gln, Trp, Asn, Gly, Cys]

Cette méthode permet donc de détecter par RMN du deutérium l'incorporation dans 12 acides aminés sur 20 et de localiser la position exacte du deutérium sur les acides aminés [206]. Ces résultats seront discutés plus amplement par la suite en les comparant avec les nôtres dans le paragraphe II.E.2.c.

A ce jour, cette technique n'a toujours pas montré sa capacité d'étudier de grosses molécules comme des protéines ou des complexes protéiques. Anderson et ses collaborateurs évoquent dans une de leurs publications que le taux d'incorporation de deutérium dans les peptides issus de protéines serait sans doute insuffisant [205]. En effet, la taille plus importante de la protéine nécessiterait, afin de garder la proportion nécessaire en acide aminé/DTT/HO[•] pour une bonne incorporation de deutérium, de générer une quantité plus importante de HO[•] susceptible de dégrader la structure protéique à trop forte concentration. Ainsi, les acides aminés accessibles mais peu réactifs incorporeraient sans doute trop peu de deutérium dans des conditions préservant la structure de la protéine. De même, dans le cas d'un résidu peu accessible, l'incorporation de deutérium serait faible et d'autant plus faible que le résidu serait peu réactif.

En s'inspirant de ces travaux, la substitution du deutérium par un tritium devrait permettre de gagner en sensibilité de détection, rendant cette approche applicable à des protéines. En effet, l'atome de tritium a l'avantage d'être quantifiable à la fois par scintillation liquide avec un seuil de détection de 5 à 10 Bq (environ 5 à 10 femtomoles de ³H) et par RMN du tritium. De plus, la structure native de la protéine devrait être préservée lors de l'échange ¹H/³H.

II.B Principe de notre méthode de détection et de quantification de radicaux

II.B.1 Principe

Le laboratoire a développé une méthode permettant la détection et la quantification des sites d'attaques des HO[•] sur les acides aminés par échange ¹H/³H. Le principe est représenté

schématiquement en deux étapes dans Figure II-3. Des radicaux hydroxyle arrachent les hydrogènes des chaînes latérales des acides aminés situés en surface de la protéine. Un agent de réparation tritié échange ensuite son tritium avec le radical formé. Ainsi, la présence d'un tritium indique la formation transitoire d'un radical carbo-centré.

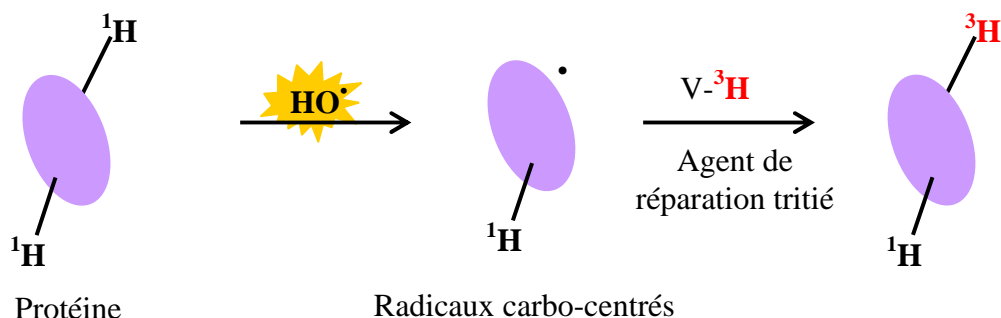


Figure II-3 Principe de marquage d'une protéine par incorporation de tritium *via* un agent de réparation tritié.

Cette approche nécessite principalement deux étapes :

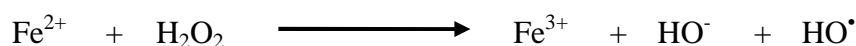
- la génération de radicaux hydroxyle
- la réparation par un donneur de tritium

II.B.2 Production des radicaux hydroxyle : HO^\bullet

Les radicaux hydroxyle sont des espèces radicalaires hautement réactives et non spécifiques, qui réagissent sur les protéines principalement en s'additionnant sur les composés aromatiques (environ $k = 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) ou en arrachant les hydrogènes des liaisons C–H des acides aminés pour former des radicaux carbo-centrés. Leur constante de vitesse de réaction avec les liaisons C–H est de l'ordre de $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ soit 10 à 100 fois moins que la vitesse de diffusion [215]. Ceci indique qu'en moyenne un arrachement d'un hydrogène intervient toutes les 10 à 100 collisions des HO^\bullet avec les hydrogènes des liaisons C–H [205]. Ainsi, les HO^\bullet très réactifs auraient tendance à réagir en surface des macromolécules et leurs diffusions dans la structure protéique seraient limitées [216]. Ces radicaux représentent ainsi un outil de choix pour les études d'accessibilité de surfaces des protéines et des interactions protéine–protéine, en permettant d'obtenir une résolution au niveau du résidu acide aminé.

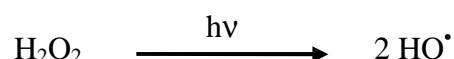
Les radicaux hydroxyle peuvent être produits de plusieurs manières. Trois grandes sources sont indiquées ci-dessous.

La réaction de Fenton permet de générer des radicaux hydroxyle en réduisant le peroxyde d'hydrogène par l'intermédiaire d'un métal de transition, le fer. La présence d'un agent réducteur, l'ascorbate, permet de régénérer Fe^{2+} et d'alimenter le cycle (Équation 1) [181].



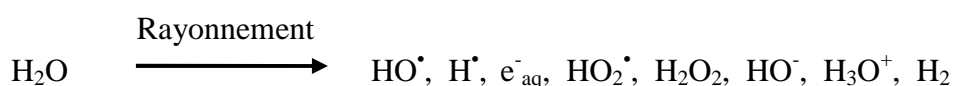
Équation 1 La réaction de Fenton

Les radicaux hydroxyle peuvent également être produits par photolyse de l'eau avec un rayonnement UV de longueur d'onde inférieure à 185 nm, ou par photolyse du peroxyde d'hydrogène avec un laser de longueur d'onde autour de 250 nm [182, 217, 218]. La rupture homolytique de la liaison O–O produit deux molécules de HO^\bullet (Équation 2).



Équation 2 La photolyse du peroxyde d'hydrogène

Les rayonnements ionisants permettent aussi de produire des radicaux hydroxyle en fournissant l'énergie nécessaire pour rompre la liaison H–O des molécules d'eau. Ce phénomène connu sous le nom de radiolyse de l'eau produit très rapidement l'ensemble des espèces représentées dans l'Équation 3.



Équation 3 La radiolyse de l'eau

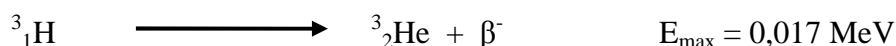
Les rayonnements ionisants peuvent être des photons de haute énergie (rayons X et rayons γ), ou des particules, comme les électrons (particules β), les noyaux d'hélium (particule α) et des neutrons rapides [180, 183, 184]. La radiolyse de l'eau a l'avantage de ne pas nécessiter l'introduction de réactifs chimiques (H_2O_2 , Fe^{2+}) dans le milieu et de supporter une grande variété de conditions expérimentales. Les deux espèces majoritairement produites sont les électrons aqueux et les radicaux hydroxyle. La production de HO^\bullet peut être favorisée au détriment des autres espèces en fonction des conditions utilisées (Chapitre IV.B.1.b).

Dans notre étude, les radicaux hydroxyle seront produits par radiolyse de l'eau soit par les électrons émis par un accélérateur linéaire (LINAC : Accélérateur linéaire d'électrons pour la radiolyse) au Laboratoire de Radiolyse du CEA, soit par autoradiolyse de l'eau tritiée dans notre laboratoire.

- **Autoradiolyse de l'eau tritiée**

Nous avons choisi d'utiliser l'eau tritiée comme source de HO[•] pour des raisons de commodité et de disponibilité pour réaliser un certain nombre d'étapes de mise au point de notre méthode. En effet, notre laboratoire est entre autre très bien équipé en matériels permettant l'utilisation d'eau tritiée de l'ordre de centaines de GBq en toute sécurité.

Dans le cas de l'utilisation de l'autoradiolyse de l'eau tritiée, l'atome de tritium se désintègre naturellement avec une émission d'un rayonnement β^- suffisamment énergétique (Équation 4) pour provoquer la coupure homolytique d'une liaison H-O (autoradiolyse) en fournissant entre autres les radicaux hydroxyle .



Équation 4 Emission d'une particule β^- par dissociation d'un atome de tritium permettant de réaliser l'autoradiolyse de l'eau [219].

L'autoradiolyse de l'eau tritiée permet de générer un *débit de dose*⁵ de l'ordre de dizaines de Gray⁶ par heure.

- **Accélérateur linéaire d'électrons : le LINAC**

L'accélérateur linéaire d'électrons (LINAC) permet pour sa part de générer les doses de dizaines de Gray en une seule impulsion de 10 nanosecondes, avec des électrons accélérés qui possèdent des énergies pouvant atteindre 10 MeV. Le rayonnement pulsé résolu en temps est un excellent outil pour l'étude des cinétiques faisant intervenir des espèces radicalaires issues de la radiolyse, et notamment pour la mesure directe des constantes de vitesses.

⁵ Le débit de dose est l'énergie fournie à la matière par unité de temps exprimé en Gy.h⁻¹ pour l'eau tritiée.

⁶ L'énergie déposée sur les échantillons est appelé *dose* et est exprimée en Gray (Gy) ou Joule par kilogramme (J.Kg⁻¹).

II.B.3 Les agents de réparation donneurs de tritium

Le donneur de tritium doit répondre dans l'idéal à plusieurs critères. Ce composé doit être le plus petit possible pour simuler l'accessibilité aux solvants des acides aminés de la protéine. De plus, l'étude des protéines en milieu aqueux suppose de trouver un composé hydrosoluble possédant une liaison $X-^3H$ non labile à pH physiologique et suffisamment réactive pour réparer les radicaux carbo-centrés. Le processus d'échange $^1H/^3H$ peut se décomposer en deux étapes mettant en jeux deux constantes de vitesse: l'arrachement d'un hydrogène par les radicaux hydroxyle suivi de la réparation par incorporation d'un tritium sur le radical carbo-centré formé (Figure II-4). Pour être un bon réparateur, la force de la liaison $X-^3H$ du donneur doit permettre l'arrachement rapide de 3H par des radicaux de type C^\bullet , avec une vitesse la plus proche possible de celle d'arrachement par les HO^\bullet d'un 1H sur une liaison $C-H$ (autour de $10^8-10^9 M^{-1}.s^{-1}$). De plus, le radical formé sur le vecteur résultant du transfert de tritium sur les résidus acides aminés, doit être très peu réactif vis-à-vis de la protéine analysée, pour éviter de former des adduits. Enfin, la synthèse de ce composé tritié doit être simple et rapide.

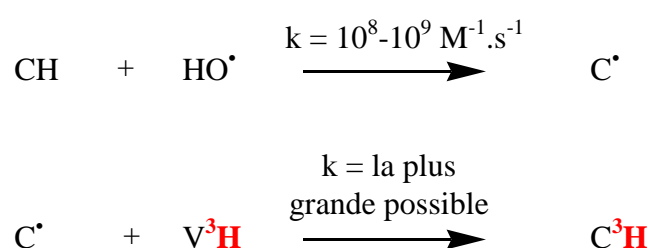


Figure II-4 Cinétique des deux étapes de l'échange $^1H/^3H$ sur une liaison $C-H$.

Différents composés sont connus pour être de bons donneurs d'hydrogène et sont utilisés notamment en chimie radicalaire. Les plus connus sont les dérivés de l'étain (liaisons $Sn-H$), du silicium ($Si-H$), du germanium ($Ge-H$), du soufre ($S-H$) comme pour le DTT et du phosphore ($P-H$) [220]. Les constantes de vitesse de transfert de leurs atomes d'hydrogène sont variables selon le type de liaison et selon les autres groupements greffés sur l'hétéroatome [220, 221]. De plus, certains composés ne sont pas solubles dans l'eau et donc inutilisables dans notre méthode.

Les composés phosphorés sont particulièrement intéressants car un certain nombre est soluble dans l'eau en raison de la présence d'oxygène sur le phosphore et de leur capacité à

former des sels. Divers composés, comme le diéthylphosphite, le diméthylphosphite, les sels de l'acide hypophosphoreux, et notamment le sel de *N*-éthylpipéridinium, sont connus comme étant de bons réducteurs [220, 222, 223].

Ainsi, le premier travail mené au laboratoire précédant mon arrivé, a été de sélectionner un bon donneur de tritium.

II.C Les résultats préliminaires du laboratoire

Les premiers travaux du laboratoire sur la détection et la quantification de radicaux sur les acides aminés ont été menés durant le post-doctorat d'Olivier Thomas. Les premières expériences ont été toutes réalisées en utilisant comme source de radicaux hydroxyle l'autoradiolyse de l'eau tritiée. Son premier travail a été de sélectionner un bon donneur de tritium.

a. Choix de l'agent donneur de tritium

En s'appuyant sur les travaux d'Anderson, il a tout d'abord choisi d'utiliser comme donneur d'atomes d'hydrogène, le DTT dans l'eau tritiée diluée isotopiquement. Contrairement à l'équipe d'Anderson qui pouvait utiliser une eau deutérée à 100 %, notre laboratoire a utilisé une eau tritiée inférieure à 0,1 % pour des raisons techniques, économiques et de radioprotection. En effet, une eau tritiée à 100% représenterait une activité volumique très élevée de plus de $1,1.10^5$ GBq.mL⁻¹. L'utilisation du DTT et d'une eau tritiée d'activité volumique de 37 à 74 GBq.mL⁻¹, a tout de même permis d'obtenir une incorporation détectable mais assez faible en tritium inférieure à 10 Bq.nmol⁻¹ sur des acides aminés.

Toutefois, le DTT n'est pas la molécule la mieux adaptée pour réaliser un échange de tritium dans des conditions aussi diluées en eau tritiée. En effet, les deux liaisons S-H labiles du DTT présentent beaucoup plus en proportion d'hydrogène que de tritium lors des échanges avec l'eau tritiée à 0,1%. Le laboratoire a très vite changé de donneur de tritium en choisissant l'agent ³H-BPASS (tritiated benzene phosphinic acid sodium salt) qui possède une liaison P-³H stable à pH 7 et permet ainsi d'obtenir un agent avec une bonne activité spécifique.

b. Préparation de l'agent de réparation tritié

Le sel de sodium de l'acide phénylphosphinique (^1H -BPASS) est synthétisé facilement dans un solvant anhydre par hydrolyse de la dichlorophénylphosphine (PhPCl_2) avec de l'eau tritiée de très haute activité spécifique, obtenue par réduction du dioxyde de platine par le gaz tritium. L'agent de réparation ^3H -BPASS est obtenu avec une bonne activité spécifique variant de 222 à 630 GBq.mmol^{-1} (soit 20 à 60 % de marquage isotopique) (Figure II-5). Cette activité spécifique de l'agent de réparation est environ mille fois supérieure à celle obtenue pour le DTT dans l'eau tritiée, dont les ^1H et les ^3H sont en échange constant.

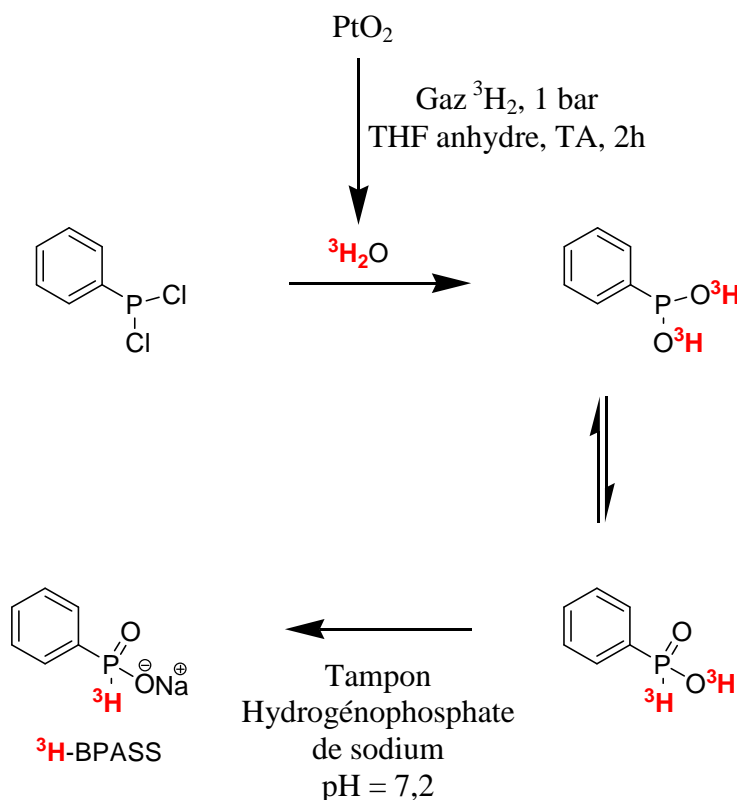


Figure II-5 Synthèse du composé phosphoré tritié ^3H -BPASS.

c. Essais de marquage sur des acides aminés avec ^3H -BPASS

Des essais préliminaires ont été réalisés en produisant les radicaux hydroxyle par autoradiolyse de l'eau tritiée, en présence de ^3H -BPASS sur cinq acides aminés en duo avec la valine ou la leucine, utilisées pour normaliser les résultats. Ces deux acides aminés ont été choisis car ils présentaient selon les travaux d'Anderson une très bonne incorporation de deutérium.

Ces acides aminés ont ensuite été dansylés et analysés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec une double détection : UV à 247 nm et radioactive par scintillation

liquide. L'incorporation de tritium a été évaluée pour chaque acide aminé en faisant le rapport entre l'incorporation de tritium et la quantité de matière, et en normalisant sur la leucine sur une base de 100. Ces premiers résultats, représentés dans la Figure II-6, montrent que tous les acides aminés testés ont incorporé du tritium.

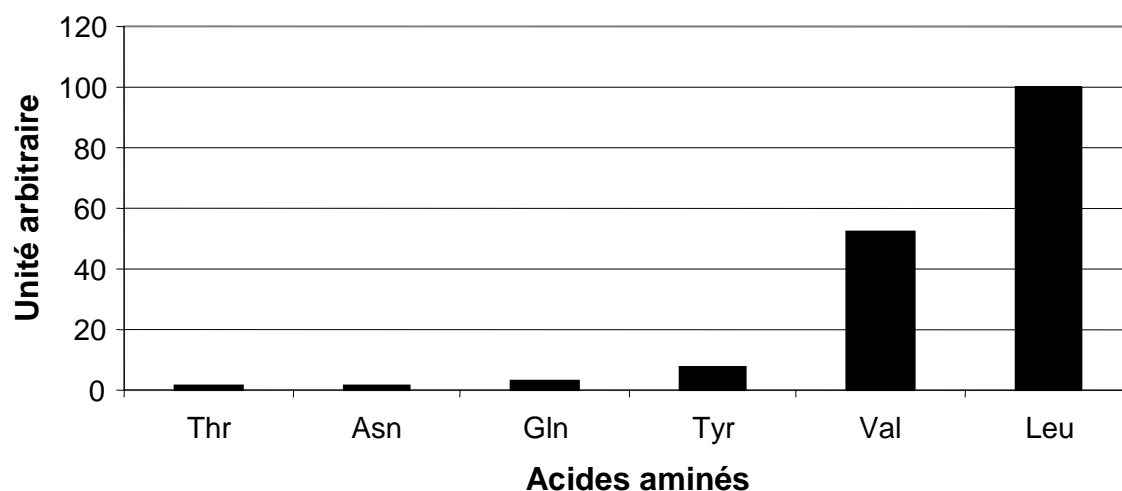


Figure II-6 Incorporation relative de tritium pour six acides aminés. Conditions expérimentales (eau tritiée 18,5 GBq.ml⁻¹, 8h soit 275 µM HO[•] cumulée ; ³H-BPASS (222 GBq.nmol⁻¹) 400 µM ; acides aminés 2*250 µM ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,2 ; saturée en N₂O)

Toutefois, les acides aminés aliphatiques (Leu et Val) incorporent plus de radioactivité que les autres acides aminés testés (Thr, Asn, Gln, Tyr). De plus, la leucine, qui présente une chaîne latérale plus longue que la valine, incorpore plus de tritium. Le nombre de CH et la longueur de la chaîne permettent-ils une meilleure incorporation de tritium ? Cette question sera commentée dans le paragraphe II.E.c.

Suite à ces résultats intéressants sur les acides aminés, la méthode a été alors appliquée à la cartographie de surface d'une protéine modèle.

d. Détection des radicaux sur une protéine entière : l'apomyoglobine

La myoglobine de cœur de cheval est une hémoprotéine globulaire de 17 kDa, constituée de 154 acides aminés, structurée en hélices α et dont la structure tridimensionnelle a été caractérisée avec une résolution de 1,7 Å (pdb 1WLA) [224]. Cette étude a été menée sur cette protéine modèle dont l'hème a été enlevé pour donner l'apomyoglobine.

La protéine (100 μM), en présence d'un équivalent en ^3H -BPASS (100 μM), est soumise à une quantité croissante de radicaux hydroxyle produits par autoradiolyse de l'eau tritiée (18,5 GBq.mL^{-1}). Après 0, 3, 6, 9 et 24 heures de réaction, la protéine est extraite et analysée par SDS-PAGE. Le gel est ensuite transféré sur membrane de PVDF et une visualisation par comptage radioactif est réalisée par Beta-imager (Figure II-7).

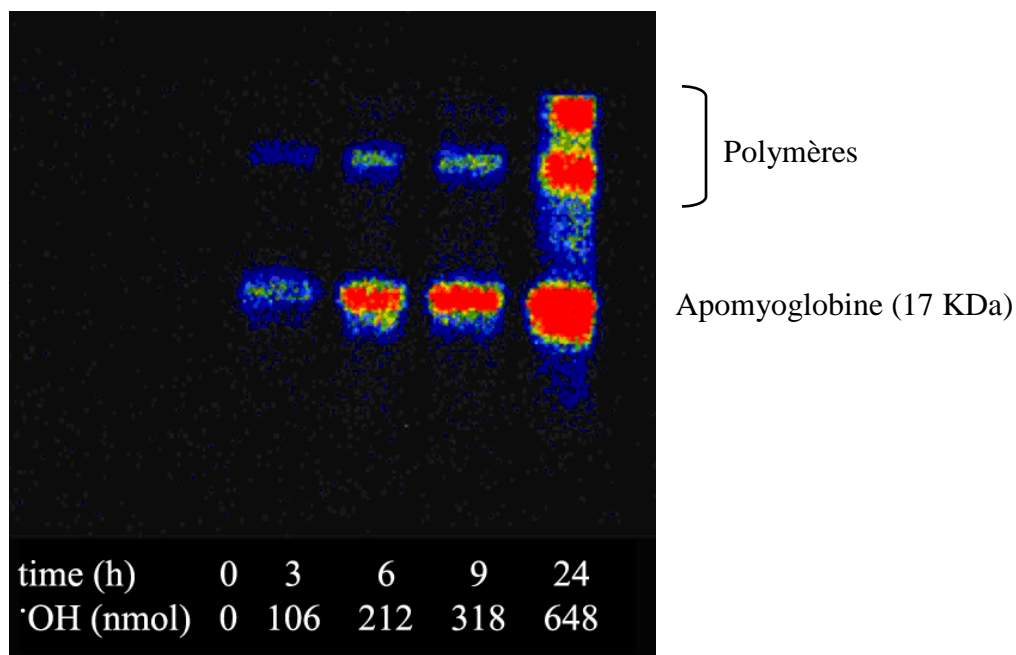


Figure II-7 Visualisation par Beta-imager d'un gel SDS-PAGE transféré sur membrane de PVDF. Radioactivité associée à l'apomyoglobine en fonction de la concentration cumulée en radicaux hydroxyle à un temps t (h). Conditions expérimentales : eau tritiée 18,5 GBq.mL^{-1} de 0 à 24 h, ^3H -BPASS (222 GBq.nmol^{-1}) 100 μM ; apomyoglobine 100 μM ; tampon phosphate 10 mM pH 7,2 ; saturée en N_2O .

De manière générale, aucun clivage de la protéine n'est observé, ce qui corrèle avec la littérature qui indique que les phénomènes de dimérisation des protéines sont favorisés en milieu anaérobie [196]. Ainsi, après 24 heures de réaction, des quantités significatives de polymères sont apparues. A contrario, peu de polymères est observé après 9 heures de réaction. Le gel indique que l'incorporation de tritium dans la protéine tend à être proportionnelle à la concentration cumulée en radicaux hydroxyle. Les expériences de contrôle n'ont montré aucune incorporation de tritium en absence de ^3H -BPASS et/ou en absence de radicaux hydroxyle.

La protéine après 9 heures de réaction, présentant à la fois un bon marquage et peu de polymères, est purifiée puis digérée par la trypsine et l'ensemble des peptides obtenus est analysé et séparé par HPLC en phase inverse (Détections UV et radioactive) (Figure II-8).

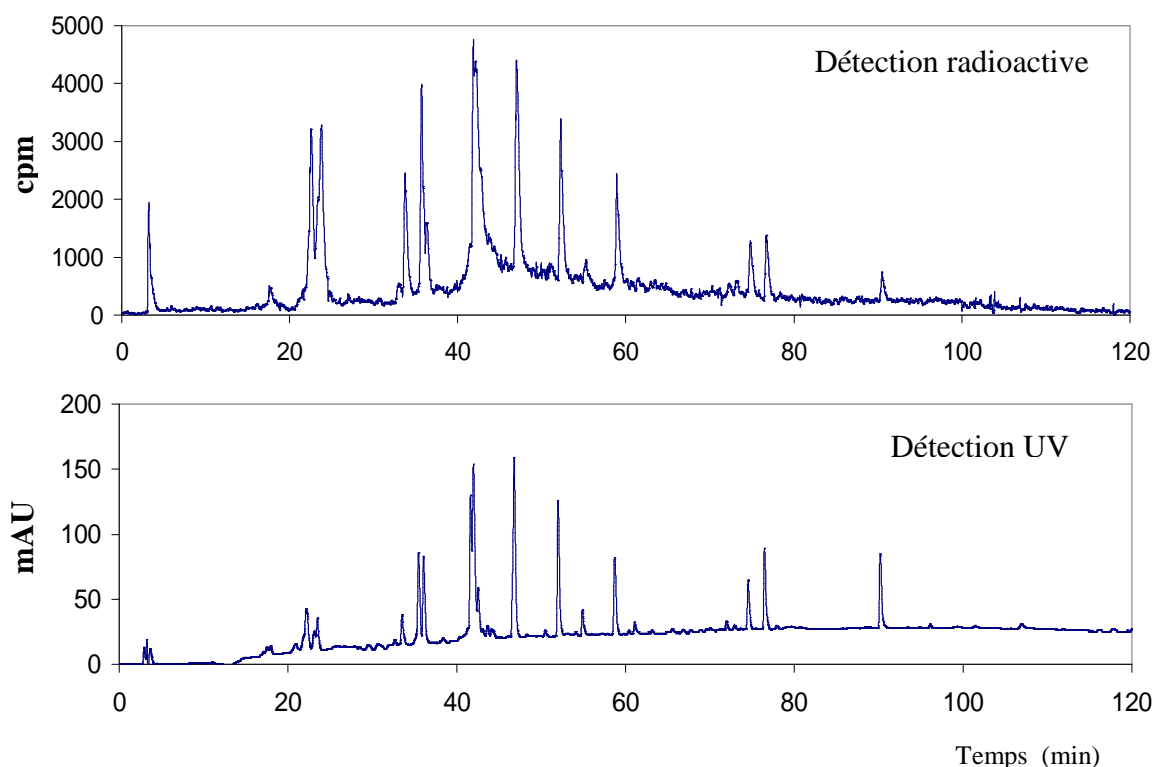


Figure II-8 Profils HPLC sur phase inverse C18 de la digestion par la trypsine (1/100 (w/w), tampon NaHCO_3 pH 8, 24 h) de l'apomyoglobine purifiée. Chromatogramme du haut : détection par scintillation liquide ; chromatogramme du bas : détection à 214 nm.

Plusieurs points importants ressortent. Premièrement, de la radioactivité est associée à chacun des peptides. Ceci montre que les conditions utilisant 1 équivalent en agent de réparation et 2 ou 3 équivalents en HO^\bullet sont suffisantes pour marquer une protéine entière. Deuxièmement, le profil de digestion en UV après échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ est le même que celui obtenu à partir de la protéine non irradiée native (non représenté). Ceci semble indiquer que les peptides résultants de la digestion ne présentent pas d'oxydations ou de dégradations significatives.

Afin d'identifier les acides aminés marqués, les peptides obtenus sont purifiés et séquencés. Les dérivés phénylthiohydantoïne-amino-acides (PTH-AA) sont collectés manuellement à chaque cycle et leur incorporation de tritium est déterminée. L'activité

spécifique en Bq.nmol^{-1} calculée pour chaque acide aminé est représentée de façon schématique sur la figure suivante.

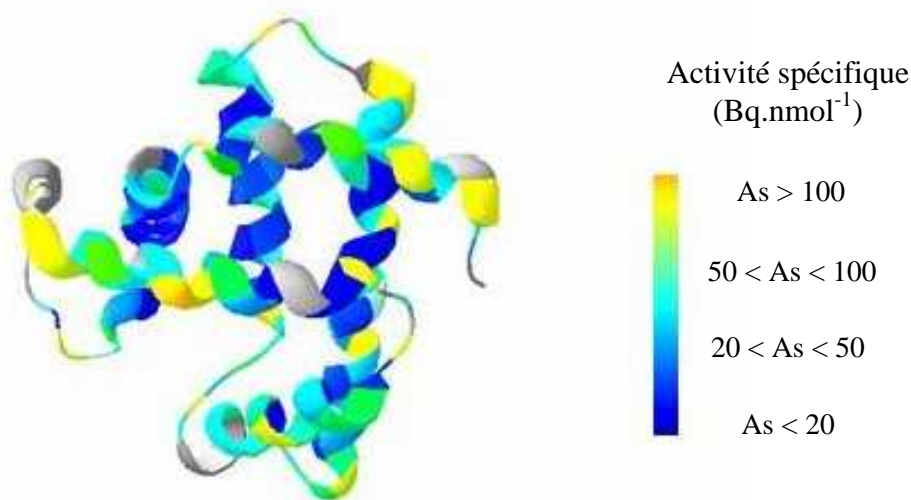


Figure II-9 Vue en 3 dimensions du niveau d'incorporation de tritium sur l'apomyoglobine (pdb 1WLA).

La détection et la quantification de radicaux sur toute la surface d'une protéine représentent une grande avancée. Toutefois, les quantités mesurées étaient parfois un peu faible du fait d'une méthode de détection utilisée pas totalement au point. Ces résultats ont néanmoins permis de réaliser une échelle grossière d'incorporation de tritium sur la surface, inutilisable en l'état pour permettre une corrélation avec les données d'accessibilité au solvant des résidus de la protéine.

• Conclusions des travaux préliminaires du laboratoire

Ces premiers travaux menés par Olivier Thomas ont montré que la méthode était tout à fait prometteuse pour détecter et quantifier des radicaux sur les protéines et ainsi pourrait être appliqué à de la cartographie de surface de protéine. De plus, des informations sur la sensibilité des protéines aux radicaux hydroxyle peuvent être obtenues à plusieurs niveaux : au niveau de la protéine en visualisant le gel SDS-PAGE, au niveau des différents peptides qui la composent en réalisant une analyse HPLC, et enfin au niveau de l'acide aminé. Toutefois, une mise au point de la méthode de détection est nécessaire pour pouvoir obtenir des données plus précises et reproductibles sur l'incorporation de tritium sur les acides aminés.

Ce premier objectif de ma thèse a donc consisté à améliorer et optimiser cette méthode notamment au niveau de la méthode de détection. De plus, afin de réaliser de la cartographie de surface ou de la caractérisation des interactions protéine–protéine, il est intéressant de connaître la réactivité relative de chacun des 20 acides aminés communs vis-à-vis des radicaux hydroxyle et du ^3H -BPASS. Les paragraphes suivants traitent donc de la mise au point de la technique de mesure de l'activité spécifique, puis de la réalisation d'une échelle de réactivité des acides aminés, ainsi que de l'application de la méthode de détection de radicaux à de petits peptides.

II.D Amélioration et optimisation de la méthode

Notre technique de mesure consiste à séquencer les peptides préalablement marqués pour obtenir les acides aminés dérivés correspondants (PTH-AA). L'activité spécifique des acides aminés collectés, exprimée en Bq.nmol^{-1} , est alors calculée à partir de deux données : la quantité de PTH-AA et la radioactivité associée. L'amélioration de la méthode de quantification peut donc être menée en optimisant la méthode de mesure UV et/ou la sensibilité de la technique de comptage de la radioactivité. Les méthodes de scintillation liquide utilisées étant déjà très sensibles, seul le protocole de mesure de DO sur les PTH-AA collectés nécessitait une amélioration (Annexe V.A).

Le premier changement, permettant de faire les analyses en routine, a été de collecter les PTH-AA en sortie de séquenceur par un collecteur automatique. Ce procédé permet de collecter environ 70 % de chacun des PTH-AA. Le protocole précédent utilisait les données du détecteur UV du séquenceur. Ce point était le principal problème de reproductibilité car il dépendait d'un rendement de collecte manuelle qui devait atteindre les 100 %. Nous avons donc choisi de réaliser une lecture UV sur les échantillons collectés (Chapitre IV.H.a). Pour permettre une mesure UV fiable, la quantité minimale d'acides aminés à collecter a été estimée à environ 250 à 500 pmoles (Annexe V.A). Les quantités ainsi collectées sont tout à fait acceptables pour permettre de réaliser un comptage fiable de la radioactivité associée. Pour obtenir les quantités requises, il est nécessaire de déposer entre 5 et 10 nmoles de peptides de 10 à 20 résidus sur le séquenceur. L'analyse des échantillons avec ce nouveau protocole permet d'obtenir au moins 95 % de l'activité théorique attendue (Annexe V.A).

Après s'être affranchi de ces problèmes de sensibilité et de reproductibilité, la mise au point d'une échelle de réactivité relative de l'ensemble des 20 acides aminés naturels vis-à-vis des radicaux hydroxyle et de l'agent de réparation tritié (^3H -BPASS) a été réalisée. Ce travail est exposé dans le paragraphe suivant.

II.E Echelle relative de réactivité des acides aminés

Afin de s'affranchir de l'utilisation d'eau tritiée de l'ordre de dizaines de GBq et de ramener le temps de génération des doses de radicaux hydroxyle de quelques heures à quelques secondes, nous avons choisi d'utiliser pour cette expérience l'accélérateur linéaire d'électrons (Chapitre IV.B).

II.E.1 Détermination de la dose nécessaire pour une incorporation de tritium satisfaisante

Une mise au point préliminaire sur un mélange entre un acide aminé aliphatique et un aromatique a été réalisée afin de connaître la dose nécessaire pour une bonne incorporation de radioactivité. Sur la Figure II-10, l'incorporation en tritium sur la leucine augmente linéairement en fonction de la dose générée. Toutefois, à de trop fortes concentrations en radicaux hydroxyle, la leucine se dégrade et de ce fait la quantité de leucine récupérée diminue fortement. Le meilleur rapport récupération/marquage est obtenu pour une dose de 1000 Gy soit environ trois équivalents en radicaux hydroxyle par rapport à l'acide aminé.

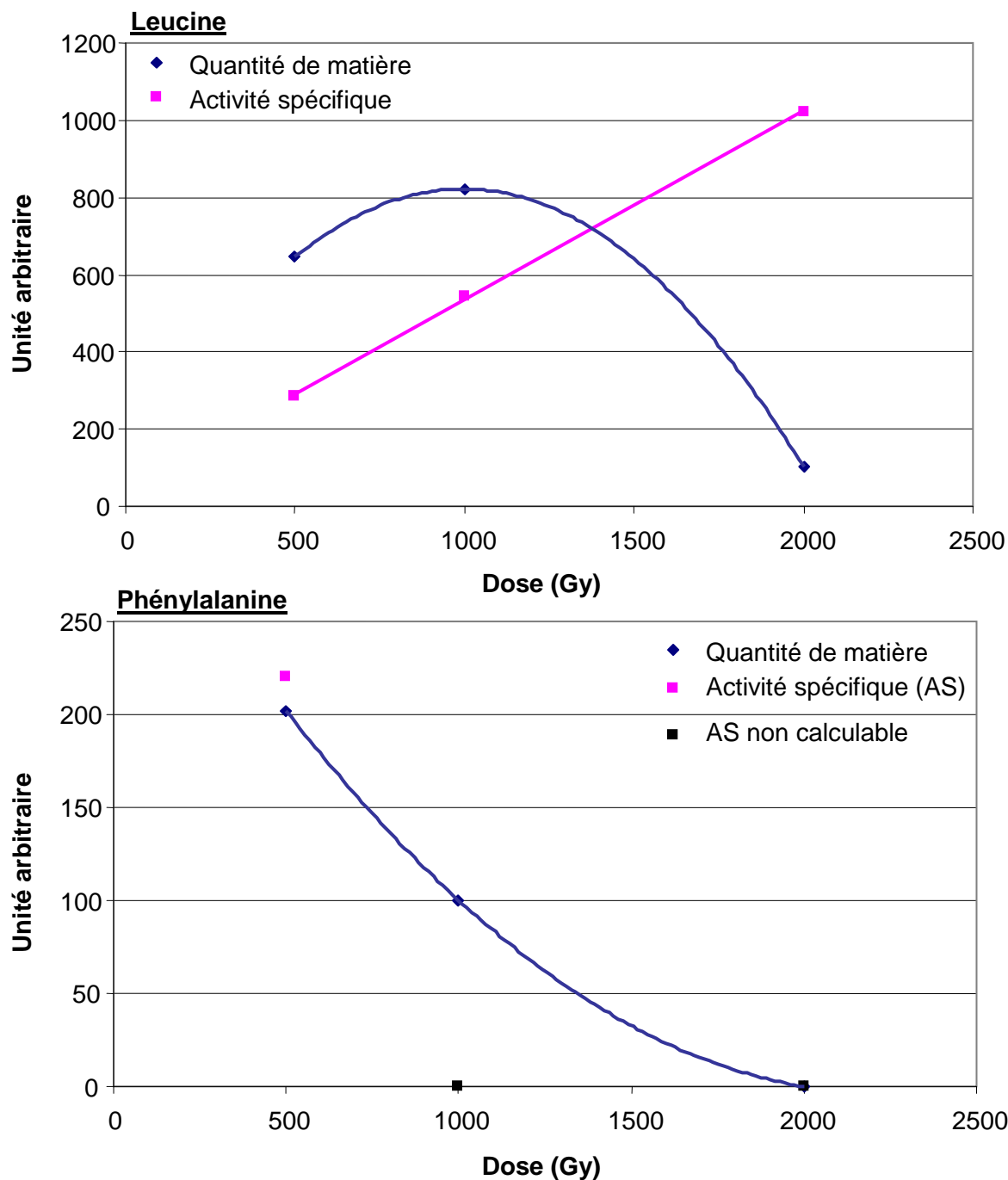


Figure II-10 Variation de l'incorporation de tritium et de la dégradation de deux acides aminés (Leu en haut ; Phe en bas) en fonction de la dose générée (Gy).

La phénylalanine présente une sensibilité accrue comparée à la leucine. En effet, la courbe correspondant à la quantité de phénylalanine récupérée diminue linéairement dès 500 Gy. De plus, dès 1000 Gy, le chromatogramme en actif présente trop de bruit de fond pour pouvoir fournir une valeur de l'aire du pic actif pertinente. Cependant, à 500 Gy, le marquage obtenu pour cet acide aminé est correct. Une expérience complémentaire avec un autre acide

aminé, l'asparagine, à 500 Gy a permis d'obtenir des valeurs exploitables en quantité de matière récupérée et en radioactivité associée. Ainsi, nous avons donc choisi d'utiliser une dose de 500 Gy pour la détermination de l'échelle de réactivité des acides aminés.

II.E.2 Etude de la réactivité des acides aminés

Chacun des 20 acides aminés (100 μM) en présence de la leucine (100 μM) est soumis au faisceau d'électrons accéléré (500 Gy ; 1,5 éq. d' HO^\bullet) en présence de ^3H -BPASS (0,5 éq.), puis les deux acides aminés sont dansylés et séparés en HPLC.

a. Comparaison autoradiolyse/LINAC

Après exposition au faisceau d'électrons accélérés, le même profil d'incorporation de tritium est observé pour les six acides aminés précédemment obtenus en utilisant l'autoradiolyse de l'eau tritiée (Figure II-6).

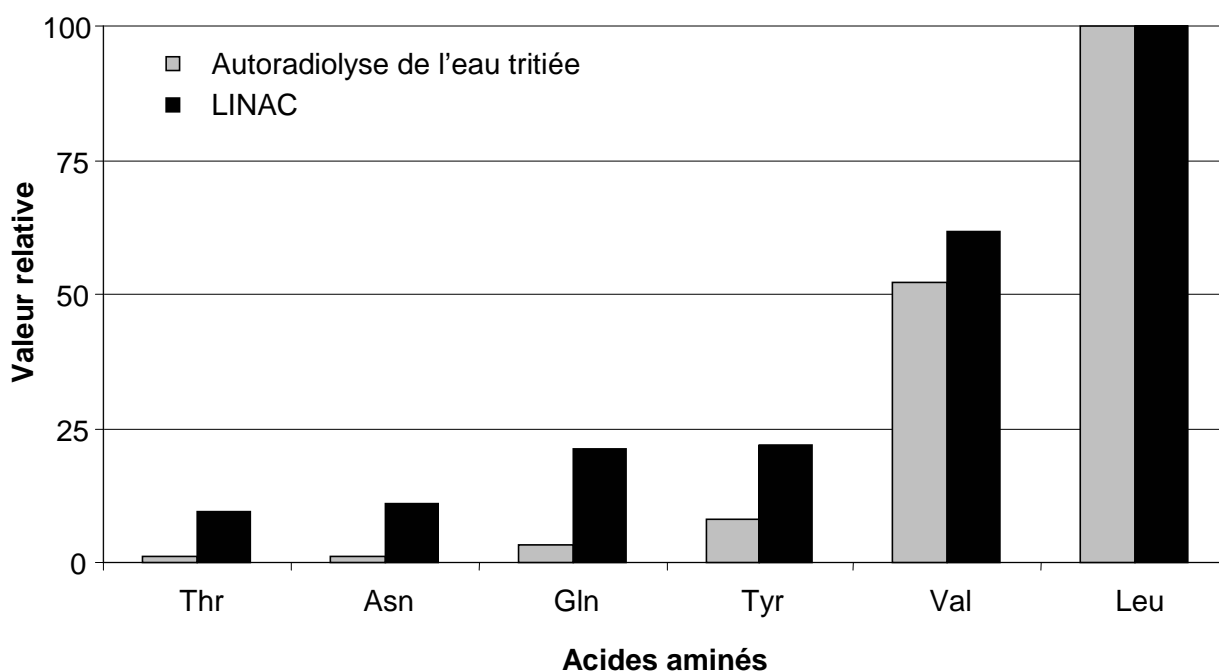


Figure II-11 Comparaison relative de l'incorporation de tritium des mêmes acides aminés en présence de radicaux hydroxyle produit par autoradiolyse de l'eau tritiée ou avec le LINAC. Conditions expérimentales: (1) autoradiolyse de l'eau tritiée : (voir légende Figure II-6) ; (2) LINAC : 25 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz soit 291 μM en HO^\bullet ; ^3H -BPASS (514 GBq.nmol^{-1}) 100 μM ; acides aminés 2*100 μM ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée en N_2O .

Cependant, la thréonine, l'asparagine, la glutamine et la tyrosine présentent, de manière significative, une meilleure incorporation relative de tritium lors de l'expérience avec le LINAC que lors de l'expérience avec l'autoradiolyse de l'eau tritiée. Ces variations sont sans doute causées par les différences de protocoles (1,5 équivalent⁷ en HO• pour le LINAC au lieu de 0,5) et surtout par l'utilisation d'un agent ³H-BPASS de meilleure activité spécifique (514 contre 222 GBq.nmol⁻¹). Toutefois, la différence des doses fournies (60 Gy.h⁻¹ ou 20 Gy/impulsion) pourrait également influencer, de manière significative, l'incorporation de tritium sur les acides aminés. Ainsi, faut-il mieux générer une plus forte concentration en HO• en peu de temps ou le contraire pour favoriser le marquage ? Ce graphique ne nous permet pas d'y répondre. Quoiqu'il en soit, il est clair que les doses très différentes générées avec des sources de rayonnements différentes (électrons accélérés, particules β) permettent d'induire une incorporation de tritium détectable et quantifiable.

b. Echelle de réactivité

Une calibration en UV et en actif du système HPLC permet d'obtenir, à partir des aires des pics des acides aminés dansylés, l'activité spécifique en Bq.nmol⁻¹ pour chacun des acides aminés normalisée sur la leucine.

Des phénomènes de « dégradation » non caractérisés et non quantifiés apparaissent pour la plupart des acides aminés sous forme de pics radioactifs supplémentaires non associés à un pic UV. En ce qui concerne les chromatogrammes UV, les pics associés aux acides aminés attendus sont présents avec un fort rapport signal sur bruit. Les « dégradations » minoritaires visibles uniquement en actif pourraient être des adduits entre les acides aminés et le ³H-BPASS qui présente une activité spécifique élevée (environ 370 KBq.nmol⁻¹ contre 0,1 à 2,5 KBq.nmol⁻¹ pour les acides aminés). En effet, en absence d'oxygène, les radicaux sur les acides aminés en solution ont tendance à s'associer entre eux en dimérisant [196, 225-227]. Les radicaux P• ou ceux délocalisés sur le noyau aromatique de ³H-BPASS peuvent tout à fait réagir avec des C• ou O• des acides aminés.

En réalisant des essais avec le LINAC dans des conditions identiques sur quelques acides aminés seuls (Leu, Trp, Phe, Cys), des adduits ont été caractérisés par LC-MS de type aa-aa,

⁷ Dans tout le manuscrit, les équivalents en HO• ou en ³H-BPASS sont calculés par rapport à la quantité d'acides aminés, de peptides ou de protéine.

aa- ^1H -BPASS et ^1H -BPASS- ^1H -BPASS, mais aussi des mono- et di-hydroxylations sur les acides aminés aromatiques. L'ensemble de ces modifications représente en intensité de signal moins de 2 %.

Afin d'améliorer encore la sensibilité (en diminuant le bruit de fond sur le chromatogramme actif), un traitement acide a été réalisé. En effet, l'agent ^3H -BPASS présente une liaison phosphore-tritium stable à pH neutre et labile dans des conditions acides. Les acides aminés présentent quant à eux des atomes de tritium liés de façon covalente aux atomes de carbone. Un traitement acide (acide trifluoroacétique (TFA) 10%) de quelques heures à température ambiante est réalisé dans le but d'échanger les tritiums rendus labiles de l'agent de réparation ayant pu se lier avec les acides aminés, tout en préservant le marquage spécifique de chaque acide aminé. Dans la plupart des cas, ce traitement permet d'obtenir des chromatogrammes actifs présentant un faible bruit de fond et peu de pics parasites conduisant à un calcul de l'activité spécifique fiable (Figure IV-17 en annexe). L'échelle de réactivité des acides aminés avec ou sans traitement TFA est représentée dans la Figure II-12.

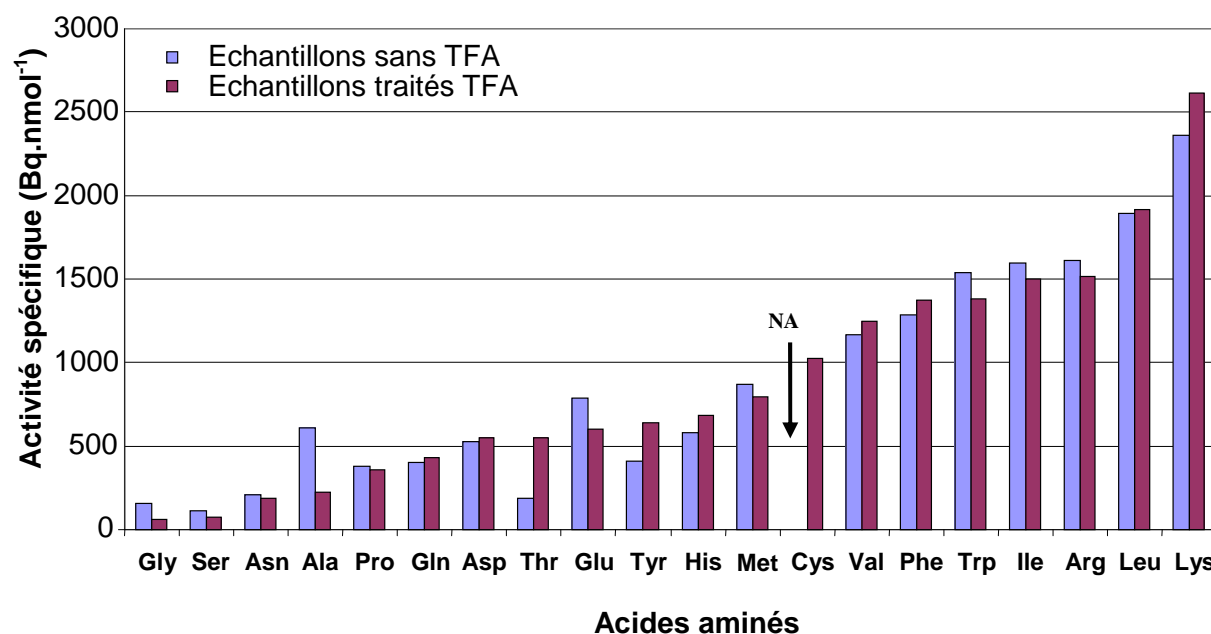


Figure II-12 Echelle relative de réactivité des acides aminés avec ou sans traitement acide (remarque : la donnée obtenue sur la méthionine est discutable car trop près du bruit de fond en UV et en actif ; NA = non attribué).

A l'exception de quatre acides aminés (Ala, Thr, Glu et Cys), l'ordre de réactivité n'est pas particulièrement changé par rapport aux échantillons non traités par le TFA. De façon

générale, l'activité spécifique de chacun des acides aminés présente le même ordre de grandeur avec ou sans traitement acide. De plus, pour dix d'entre eux (Gln, Asp, Thr, Tyr, His, Cys, Val, Phe, Leu et Lys), l'activité spécifique est légèrement augmentée, dont celle de la thréonine qui est triplée et même celle de la cystéine qui peut être mesurée. Ceci tend à prouver que le traitement acide n'enlève pas le marquage des acides aminés. Bien au contraire, il permet d'abaisser le bruit de fond des chromatogrammes radioactifs et ainsi d'augmenter la résolution des pics actifs. Ainsi, des activités spécifiques surestimées (Ala et Glu) en raison d'une mauvaise séparation par HPLC entre les acides aminés dansylés et des impuretés très minoritaires mais hautement marquées par des atomes de tritium labiles, ont pu être précisées grâce au traitement acide.

c. Discussion

La réactivité des acides aminés vis-à-vis des radicaux hydroxyle a été beaucoup étudiée en milieu aérobie en utilisant la radiolyse pulsée combinée à des détections UV/visible et/ou à la spectroscopie par résonance paramagnétique électronique. La réactivité des HO[•] est favorisée là où le radical sera stabilisé par des groupements voisins tels que des doubles liaisons, des cycles aromatiques, des hétéroatomes riches en électrons et de façon moindre par des groupements alkyle donateurs d'électrons [196]. Deux phénomènes permettent de stabiliser ces radicaux. Le premier délocalise des électrons sur d'autres atomes à travers le chevauchement d'orbitales atomiques contenant des électrons non appariés avec les orbitales π . Le second transfère des électrons à travers les liaisons σ des groupements alkyles vers le centre radicalaire déficient en électrons. Bien que les radicaux hydroxyle réagissent rapidement sur la plupart des liaisons C-H des acides aminés en arrachant des atomes d'hydrogène, les réactions d'addition sur les systèmes insaturés (doubles liaisons, cycles aromatiques) sont encore plus rapides et même prédominant [196]. Ce phénomène est lié au caractère électrophile du radical hydroxyle qui réagit donc préférentiellement sur les sites riches en électrons.

Une échelle de réactivité de ces acides aminés à un pH autour de 7 est représentée dans le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** [196, 215]. De manière générale, ce sont les acides aminés soufrés et aromatiques qui sont les plus sensibles à l'attaque des HO[•], suivis des acides aminés aliphatiques.

Acides aminés	Réactivité (M ⁻¹ .s ⁻¹)	pH	Acides aminés	Réactivité (M ⁻¹ .s ⁻¹)	pH
Cys*	3,5.10 ¹⁰	7,0	Pro	6,5.10 ⁸	6,8
Trp*	1,3.10 ¹⁰	6,5–8,5	Gln	5,4.10 ⁸	6,0
Tyr*	1,3.10 ¹⁰	7,0	Thr	5,1.10 ⁸	6,6
Met*	8,5.10 ⁹	6–7	Lys	3,5.10 ⁸	6,6
Phe*	6,9.10 ⁹	7–8	Ser	3,2.10 ⁸	~6
His*	4,8.10 ⁹	7,5	Glu	2,3.10 ⁸	6,5
Arg	3,5.10 ⁹	6,5–7,5	Ala	7,7.10 ⁷	5,8
Ile	1,8.10 ⁹	6,6	Asp	7,5.10 ⁷	6,9
Leu	1,7.10 ⁹	~6	Asn	4,9.10 ⁷	6,6
Val	8,5.10 ⁸	6,9	Gly	1,7.10 ⁷	5,9

Tableau II-1 Constante de vitesse de réaction des acides aminés avec les radicaux hydroxyle autour du pH neutre (* vitesses de réaction attribuées en majorité à des phénomènes autres que l'arrachement d'hydrogène sur les C–H) [196, 215]

Toutefois, tous les acides aminés ne subissent pas le même type de réaction avec les HO[•]. Ainsi, les radicaux hydroxyle réagissent quasi exclusivement par arrachement de l'hydrogène du groupement thiol de la cystéine, l'acide aminé le plus réactif. La vitesse de réaction des HO[•] sur la méthionine correspond pour sa part à un rapport 80/20 d'addition de l'hydroxyle sur le soufre et d'arrachement d'hydrogène sur les liaisons C–H. Les HO[•] réagissent principalement avec les acides aminés aromatiques par addition sur le cycle. Sur tous les autres acides aminés, la réaction principale est l'arrachement d'hydrogène sur les liaisons C–H. Les acides aminés aliphatiques à longue chaîne sont très réactifs, suivis de l'arginine qui présente elle-même une réactivité dix fois supérieure à celle de la lysine. Les acides aminés à chaîne courte tels l'alanine et la glycine sont les moins réactifs ainsi que les acides aminés chargés négativement (Asp et Glu) et l'asparagine.

Lors de leur étude visant à réaliser la cartographie de surface de protéines, l'équipe de Chance a déterminé une échelle de réactivité des acides aminés en milieu aérobie vis-à-vis des radicaux hydroxyle et des oxydations de l'oxygène moléculaire à partir d'amino-amides isolés

(mimant la liaison peptidique) ou de petits peptides (G–X–G) [184]. L'ordre de réactivité est obtenu en analysant les oxydations des résidus acides aminés par spectrométrie de masse :

Cys>Met>Trp>Tyr>Phe> His>Leu, Ile>Arg, Lys, Val>Ser, Thr, Pro>Gln, Glu>Asp, Asn>Ala>Gly

Cette étude confirme la tendance du tableau II-1 où les acides aminés soufrés, aromatiques, aliphatiques et chargés positivement sont les plus sensibles vis-à-vis des HO[•]. Les acides aminés Asn, Asp, Ala et Gly sont de nouveau les résidus les moins oxydés. Logiquement, notre échelle de réactivité est différente de celle de l'équipe de Chance. En effet, ce sont les acides aminés aliphatiques et chargés positivement qui sont les plus réactifs, suivi des aromatiques et des acides aminés soufrés. Ces différences sont directement dues à la différence de mécanisme de deux phénomènes : la réparation par un donneur d'hydrogène et l'oxydation par le dioxygène. Dans notre cas, en milieu anaérobie, la réparation des radicaux carbo-centrés se fait par incorporation d'un tritium. Ce phénomène est dépendant de la proportion d'arrachement d'hydrogène des liaisons C–H. Les acides aminés aliphatiques y sont notamment plus enclins [206]. Dans le cas de Chance, les radicaux vont réagir avec les molécules d'oxygène en oxydant les résidus, un phénomène qui est typiquement favorisé sur les acides aminés aromatiques et soufrés.

Toutefois, l'analyse et l'interprétation de nos résultats sont plus pertinentes en les comparant avec ceux d'Anderson obtenus en milieu anaérobie avec un système de réparation similaire par le deutérium. L'échelle de réactivité obtenue avec leur méthode est la suivante [206]:

Leu>Ile>Val>Arg>Lys>Tyr>Pro>His>Phe>Met>Thr>Ala>[Glu, Ser, Asp, Gln, Trp, Asn, Gly, Cys]

Nos résultats, obtenus en incorporant du tritium et en utilisant un agent de réparation différent, présentent un ordre de réactivité semblable, avec notamment une augmentation de la gamme d'acide aminé détectable (18 acides aminés au lieu de 12 pour la méthode au deutérium).

Lys>Leu>Arg>Ile>Trp>Phe>Val>Cys>Met>His>Tyr>Glu>Thr>Asp>Gln>Pro>Ala>Asn>[Ser, Gly]

L'interprétation des résultats est présentée ci-dessous par famille d'acide aminé.

i. Les acides aminés aliphatiques

Le même ordre de réactivité est obtenu avec les deux méthodes utilisant le tritium ou le deutérium pour les acides aminés aliphatiques : Leu>Ile>Val>Ala>Gly. Ces résultats sont plutôt en accord avec l'ordre de réactivité vis-à-vis des radicaux hydroxyle répertorié dans le tableau II.1. Précédemment, il a été fait mention que la principale action des radicaux hydroxyle sur les acides aminés aliphatiques est d'arracher les hydrogènes des liaisons C–H. Tout particulièrement, à pH physiologique, les sites principaux d'arrachement des hydrogènes se trouvent sur les liaisons C–H des chaînes latérales des acides aminés. Selon la littérature, le manque de réactivité sur le C α –H de la chaîne principale est dû à la désactivation induite par les groupements ammonium et carboxylate dans la forme zwitterionique de l'acide aminé à ce pH [196, 228, 229]. Ceci peut expliquer la faible incorporation de deutérium ou de tritium sur la glycine pour leur méthode et la nôtre [206].

L'équipe d'Anderson a identifié par RMN du deutérium les sites d'incorporation pour chacun des acides aminés aliphatiques et a donc pu identifier les liaisons C–H les plus réactives [206]. Ainsi, ils montrent que les hydrogènes des groupements méthine (CH) des chaînes latérales sont plus réactifs que ceux des groupements méthylène (CH₂) et que ceux des groupements méthyle (CH₃). En effet, généralement ce sont les radicaux carbo-centrés les plus stables qui sont favorisés et l'ordre de stabilité des C \cdot est le suivant : carbone tertiaire > secondaire > primaire [196]. Toutefois, en fonction du nombre d'hydrogène, les sites CH₃ présentent plus d'incorporation de deutérium que les CH₂ et les CH. En effet, les radicaux tertiaires sont plus stables, donc moins enclins à être réparés, ce qui pourrait expliquer la moindre réactivité des thiols vis-à-vis des radicaux tertiaires [196, 230]. De plus, l'incorporation de deutérium sur les CH₃ augmente avec l'éloignement du carbone α . L'effet désactivant des groupements ammonium et carboxylate a en effet tendance à se répercuter sur l'ensemble de la chaîne latérale, et notamment sur les liaisons C–H les plus proches [228, 231, 232].

Nos résultats et les leurs indiquent ainsi une relation directe entre la quantité de tritium ou de deutérium incorporée et la longueur de la chaîne latérale aliphatique. Plus la chaîne est longue, plus il y a d'incorporation de tritium ou de deutérium, ce qui explique l'ordre de réactivité suivant : Leu>Ile>Val>Ala>Gly pour ces deux méthodes. Le type de détection utilisé dans notre méthode (détection UV et radioactive) ne permet pas d'identifier les liaisons

C–H impliqués dans l’incorporation de tritium. Cependant, la similarité de réactivité de ces acides aminés aliphatiques avec les deux méthodes suggérerait le même mécanisme de réaction.

La méthode de planigraphie par le tritium développée par l’équipe de Shishkov et Baratova montre pour sa part, sur des acides aminés isolés et sur une protéine, que l’incorporation de tritium dans différents résidus acides aminés présente une probabilité égale quand le calcul est ramené à une seule liaison C–H [208, 210]. Les auteurs indiquent qu’aucune variation d’incorporation n’est observée en fonction de la nature du groupement voisin ou de la localisation du site de marquage (extrémités N ou C-terminales) [210]. Ainsi, cette réactivité semble être en relation linéaire avec l’accessibilité des C–H des résidus de la protéine.

Toutefois, ces hypothèses de réactivité des $^3\text{H}^\bullet$ sur les C–H, idéales pour réaliser du « footprinting » ou de la cartographie de surface, ont été remises en cause. En effet, des résultats contradictoires ont été obtenus par une autre équipe à partir d’étude sur des di- et tri-peptides, où les acides aminés aliphatiques à longue chaîne (Leu, Ile, Val) présentent une incorporation de tritium plus élevée [233]. L’explication avancée est que l’arrachement d’hydrogène des atomes de carbone tertiaires, présents uniquement sur ces chaînes latérales, est plus facile que pour d’autres configurations de l’atome de carbone. Ceci serait en adéquation avec la remarque citée précédemment sur la plus grande stabilité des radicaux formés sur les groupements méthine.

ii. Les acides aminés chargés positivement

Notre échelle relative montre que l’arginine et la lysine sont parmi les trois acides aminés les plus réactifs (avec la leucine) vis-à-vis des HO^\bullet et de notre agent de réparation tritié. Ces résultats sont en accord à la fois avec les bonnes constantes de vitesse de réaction avec les HO^\bullet de la Lys et de l’Arg (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) et avec ceux d’Anderson qui montraient une très bonne réactivité de ces deux résidus juste derrière les acides aminés aliphatiques à longue chaîne.

Ses données de RMN du deutérium apportent des précisions supplémentaires sur les sites d’incorporation de deutérium. Tous les groupements méthylène (β , γ , δ) présentent de l’incorporation mais le plus réactif est celui (δ) situé en amont du groupement guanidinium

chargé positivement [206]. Une étude RPE montre que ce groupement a un effet activateur sur l'arrachement par les HO• d'hydrogène des C_δ-H [234]. L'incorporation sur la lysine montre aussi de l'incorporation de deutérium sur tous les CH₂ mais trois fois plus sur les C_γ et les C_ε. La bonne incorporation de deutérium obtenue sur le C_ε va à l'encontre d'une hypothèse selon laquelle les groupements méthylène adjacents au groupement ammonium sont plutôt désactivés et qu'ainsi les HO• réagissent préférentiellement sur les C_γ et le C_δ les plus éloignés des deux groupements ammonium en α et ε.

Nos résultats, résolus à l'échelle de l'acide aminé, et non atomique, ne permettent pas de trancher entre ces deux hypothèses. Pour autant, l'incorporation très significative de tritium observée avec notre méthode peut être due évidemment à la bonne réactivité intrinsèque vis-à-vis des HO• de l'arginine et de la lysine (activée ou non par les groupements protonnés ammonium et guanidinium), mais peut être aussi à la simple présence d'une charge positive sur l'extrémité des chaînes latérales. Notre agent de réparation tritié PhP³H(O)O⁻Na⁺ sous forme de sel, chargé négativement, est peut-être attiré par ces charges positives et se localiserait préférentiellement près des radicaux carbo-centrés formés sur ces chaînes latérales et ainsi les réparerait.

La proline possède aussi à pH physiologique une charge positive sur l'amine N-terminale incluse dans le cycle de la chaîne latérale. L'étude par RMN du deutérium d'Anderson montre que l'incorporation de deutérium se fait préférentiellement sur le C_γ, puis sur le C_δ le plus proche de cette charge et enfin sur le C_β [206]. Ainsi, cette pseudo charge ne désactive pas le site C_δ. Notre approche permet, tout comme celle d'Anderson, une incorporation de tritium sur la proline suffisante pour notre méthode de détection.

iii. Les acides aminés soufrés

La méthionine et la cystéine présentent une bonne activité spécifique avec notre méthode. Ces deux acides aminés sont parmi les plus réactifs selon les constantes de vitesses de réaction des HO• avec les acides aminés (Met : $8,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et Cys : $3,5 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) [196, 215]. Cependant, les HO• réagissent quasi exclusivement avec la cystéine en arrachant un hydrogène sur le groupement thiol, une position labile. Evoquant cette raison, l'équipe d'Anderson ne détecte aucune incorporation de deutérium sur la cystéine [205]. Le marquage observé sur la cystéine avec notre méthode laisse à penser que des radicaux C• sont tout de même formés et doivent être bien réparés par ³H-BPASS.

En ce qui concerne la méthionine, l'arrachement d'un hydrogène sur les liaisons C–H se produit à hauteur de 20% et plus particulièrement sur les positions C_γ ou C_ε [196, 206, 235]. La réparation directe de ces formes est le mécanisme le plus probable. Il est à noter que cette même méthionine impliquée dans un peptide est plus sujette à ce dernier mode d'action qu'à son oxydation en sulfoxyde [206]. Toutefois, nos résultats obtenus sur ce résidu prêter à caution car peu de produit a été récupéré après l'irradiation suggérant une dégradation importante de cet acide aminé (oxydation, décarboxylation,...) [196, 236].

iv. Les acides aminés aromatiques

La réactivité des acides aminés aromatiques vis-à-vis des HO[•] et de ³H-BPASS est dans l'ordre suivant : Trp, Phe>His>Tyr. La littérature fait mention de la haute réactivité des radicaux hydroxyle s'additionnant sur les cycles des quatre acides aminés aromatiques. Peu ou pas de phénomènes d'arrachement d'hydrogène sur les chaînes latérales ne sont rapportés.

Pour leur part, les études préalables menées par Anderson montrent que ce phénomène existe tout de même avec principalement du marquage sur le groupement méthylène en position β. L'histidine présente aussi des atomes de deutérium sur la position C2 et un peu sur C4 de son groupement imidazole. La tyrosine présente un tiers d'incorporation sur ces positions C3 et C5 du groupement phénol [206]. La phénylalanine présente de l'incorporation de deutérium uniquement sur la position β. Enfin, aucune incorporation n'est observée par RMN du deutérium sur le tryptophane.

Pourtant, nos résultats montrent que le tryptophane est un des résidus aromatiques les plus réactifs vis-à-vis de notre méthode. Dans la littérature, il a été montré qu'en absence d'oxygène, l'adduit hydroxyle formé sur l'indole du tryptophane avait tendance à être éliminé sous forme d'eau pour donner naissance à un N[•] puis par délocalisation à un C[•] sous forme de radical indolyloxy [216, 237]. Le ³H-BPASS, en plus de la réparation en position β, transfère peut-être un tritium sur cette position de l'indole. De plus, ³H-BPASS lui-même aromatique, est peut être impliqué dans une interaction de type « π-stacking » qui le rapprocherait de l'acide aminé aromatique et favoriserait la réparation des radicaux formés sur ces résidus.

v. Les acides aminés hydroxylés

Entre la méthode d'Anderson et la nôtre, le même ordre de réactivité est observé concernant la sérine et la thréonine. Dans les deux cas, la sérine est peu ou pas marquée et la thréonine présente une activité spécifique moyenne. Pourtant, dans la littérature, le groupement hydroxyle situé sur les chaînes latérales favorise l'arrachement d'hydrogène les liaisons C–H adjacentes, car il possède un effet stabilisant du radical en délocalisant les électrons [196, 238]. Ainsi, 84 % des atomes d'hydrogène arrachés sur les liaisons C–H de l'éthanol sont en α du groupement hydroxyle, contre 13 % sur le groupement méthyle. De plus, la sérine et la thréonine sont sujettes, en absence d'oxygène, à subir une désamination rapide suite à cet arrachement en α du groupement hydroxyle. La vitesse de désamination est peut être plus rapide que la vitesse de transfert de tritium sur le radical carbo-centré formé. Ceci pourrait expliquer la faible quantité de tritium incorporé sur la sérine.

vi. Les acides aminés chargés négativement et leur amide

Les activités spécifiques de Asn, Asp, Gln et Glu sont parmi dans la moitié inférieure de notre échelle de réactivité. Ce fait est cohérent avec la réactivité des radicaux hydroxyle sur ces acides aminés observés par RPE : Asn $4,9.10^7$; Asp $7,5.10^7$; Glu $2,3.10^8$; Gln $5,4.10^8$ $M^{-1}.s^{-1}$ qui sont aussi dans la seconde moitié du tableau II.1. Lors des études d'Anderson, aucune incorporation n'est observée par RMN du deutérium, alors qu'en utilisant une méthode de détection plus sensible, la spectrométrie de masse, une très faible incorporation est détectée [206].

Notre méthode permet une incorporation de tritium faible ou moyenne mais suffisante pour une détection des radicaux formés sur ces acides aminés isolés. Nos résultats vont dans le sens de la littérature où il est mentionné que les groupements carboxylate et carboxamide ont un effet stabilisant des radicaux adjacents [216, 239]. Ainsi, ces radicaux stables auraient moins tendance à arracher les hydrogènes, d'où un marquage faible ou moyen. Une tendance indique que la présence d'un groupement méthylène supplémentaire dans Gln et Glu favorise une meilleure incorporation de tritium respectivement que Asn et Asp. Ceci concorde aussi avec la réactivité des acides aminés du tableau II.1. Le groupement carboxamide tendrait à être plus stabilisant que le groupement carboxylate à la vue de nos résultats : Asn<Gln<Asp<Glu.

d. Conclusion intermédiaire

Notre échelle de réactivité des acides aminés vis-à-vis des HO[•] et de ³H-BPASS est plutôt concordante avec les résultats de la littérature qui utilisent d'autres méthodes. Cependant, notre méthode a le mérite de pouvoir détecter les radicaux sur l'ensemble des 20 acides aminés communs à l'exception de la glycine et de la sérine.

L'étude d'Anderson permet de détecter par RMN du deutérium de l'incorporation sur seulement 12 acides aminés sur 20 [206].

La méthode de détection des radicaux par oxydation en milieu aérobie et spectrométrie de masse développée par l'équipe de Chance permet quant à elle de détecter et d'utiliser 14 acides aminés sur 20. En effet, à l'exclusion de 4 acides aminés (Asn, Asp, Ala et Gly) trop peu réactifs et de la Thr et la Ser, qui présentent une bonne réactivité, mais qui ont des produits d'oxydation qui ne sont pas facilement identifiables, les 14 autres acides aminés sont utilisables pour apporter des informations lors des expériences de « footprinting » [184]. L'ensemble de ces résidus ne représente que 65 % de la séquence d'une protéine type. Cette méthode est donc intéressante mais tout de même limitée pour réaliser du « footprinting ».

Notre échelle de réactivité obtenue sur des acides aminés isolés indiquerait que notre méthode permettrait d'utiliser respectivement 4 et 6 acides aminés de plus que celle de Chance et d'Anderson. En ne comparant que la réactivité sur les acides aminés isolés, notre méthode permet d'obtenir une meilleure couverture de la surface protéique et donc une meilleure résolution pour la caractérisation des interactions protéine-protéine. Toutefois, comme le supposait Anderson pour sa méthode, l'incorporation d'un isotope de l'hydrogène sur les chaînes latérales des acides aminés est sans doute plus aisée sur des acides aminés isolés et sur de petits peptides que sur une protéine entière. En effet, l'encombrement stérique et les « effets de voisins »⁸ dans une protéine pourraient perturber l'incorporation de tritium.

Avant de passer à la cartographie de surface protéique et/ou à la caractérisation d'interactions protéine-protéine, une deuxième étape à franchir est de montrer que notre méthode est capable de détecter et quantifier les radicaux sur des peptides. Après avoir rendu

⁸ Effets de voisins : effets d'encombrement stérique ou de charge sur la réactivité des acides aminés voisins dans la séquence protéique et/ou dans l'espace.

la méthode de détection fiable et reproductible (Chapitre II.D), nous avons ensuite appliqué notre approche à de petits peptides non structurés présentant ainsi une surface d'accessibilité la plus proche possible de celles des acides aminés isolés.

II.F Détection et quantification des radicaux sur des peptides

II.F.1 Essais de marquage sur des peptides

Les premiers essais de détection de radicaux sur les peptides ont été fait en utilisant l'eau tritiée comme source de radicaux hydroxyle. Une étude est tout d'abord menée afin de déterminer l'effet de la concentration cumulée en HO^\bullet sur l'incorporation en radioactivité des acides aminés d'un petit peptide de sept résidus, le kemptide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly). Ce peptide contient à la fois des résidus très réactifs par rapport à notre méthode (Leu, Arg) et d'autres très peu réactifs (Ala, Ser, Gly) selon l'échelle de réactivité déterminée dans le paragraphe II.E.2.b.

- **Effet de la concentration cumulée en HO^\bullet sur l'incorporation de tritium**

Les activités spécifiques des acides aminés du peptide sont représentées dans la Figure II-13.

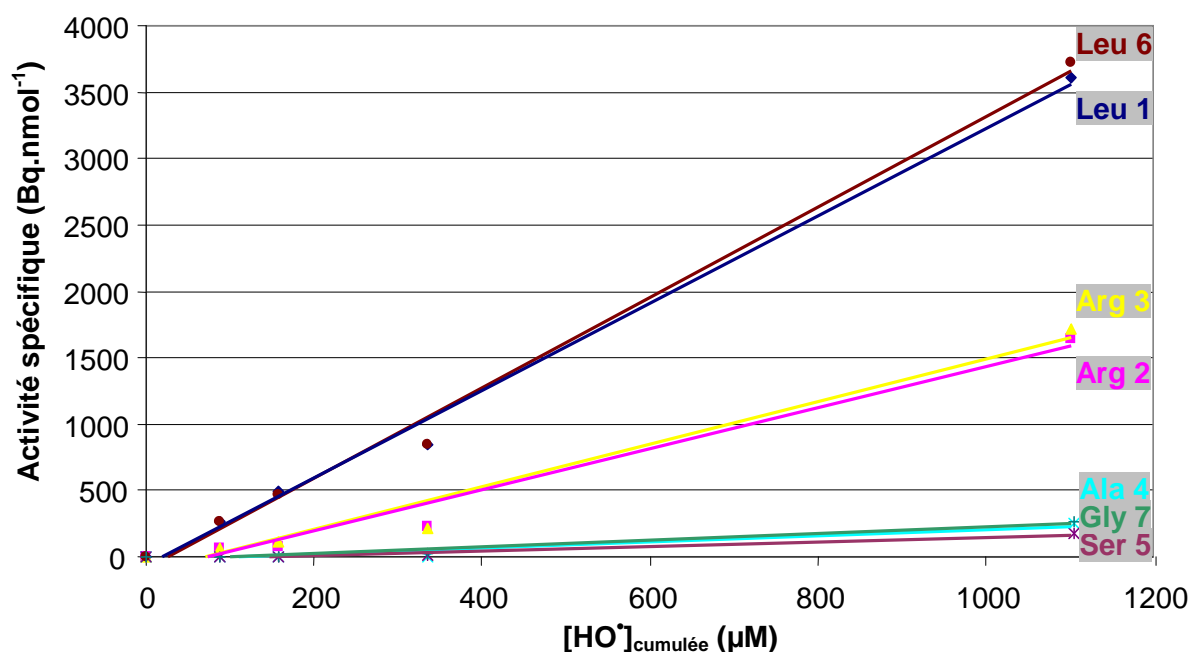


Figure II-13 Effet de la concentration cumulée en HO^\bullet sur l'incorporation de tritium sur les acides aminés du kemptide. Conditions expérimentales : kemptide 100 μM ; eau tritiée 18,5 GBq.mL^{-1} (HO^\bullet 35,3

$\mu\text{M.h}^{-1}$) ; $^3\text{H-BPASS}$ 360 μM (AS = 204 GBq.mmol $^{-1}$) ; Tampon Phosphate 10 mM pH 7,2 ; saturée en N_2O .

Le premier constat est que l'ordre de réactivité Leu>Arg>Ala, Ser, Gly est conservé par rapport à l'échelle de réactivité des acides aminés isolés vis-à-vis des HO^\bullet générés par des électrons accélérés. A l'instar de la Figure II-11, cette observation confirme la polyvalence de notre méthode vis-à-vis des sources de rayonnement utilisables pour former les HO^\bullet .

De plus, chacun des acides aminés incorpore linéairement du tritium en fonction de la quantité de HO^\bullet générés au cours du temps. Avec un nombre d'équivalents en HO^\bullet croissant, les activités spécifiques des acides aminés peu marqués (Ala, Gly, Ser) deviennent significatives. La quantité générée de radicaux hydroxyle est donc un facteur très important à prendre en compte pour incorporer suffisamment de radioactivité sur la surface des protéines dans le but de réaliser des études de « footprinting ».

Enfin, dans ce peptide, l'incorporation de tritium est équivalente pour les deux leucines entre elles, ainsi que pour les deux arginines. Ce fait est très intéressant pour envisager de cartographier les surfaces protéiques. En effet, un point important pour sonder la surface d'une protéine est d'obtenir une incorporation de tritium équivalente pour deux acides aminés identiques présentant une accessibilité au solvant similaire mais situés à deux endroits différents de la protéine.

Afin de confirmer ou d'infirmer ce dernier point, nous avons mené une étude sur huit peptides en mélange, non structurés et de séquences variées présentant environ huit acides aminés chacun.

- **Test sur un mélange peptidique**

Quatre des peptides sur les huit ont été séquencés et l'activité spécifique de chacun des acides aminés déterminée⁹ (Figure II-14).

Cette étude confirme que notre méthode est capable de détecter les radicaux sur de petits peptides puisque tous les acides aminés présentent du marquage radioactif. Toutefois, tous les

⁹ Seules les données conformes aux règles décrites dans la partie IV.H du Matériels et Méthodes ($\text{DO} > 0,1$ et $^3\text{H} > \text{à } 5 \text{ fois le bruit de fond}$) sont représentées sur ces histogrammes.

acides aminés aromatiques et les acides aminés chargés négativement présents dans ces peptides possèdent une très faible activité spécifique. Tous les autres acides aminés présents dans ces peptides possèdent une incorporation de tritium significative. Notamment, la glycine, la sérine et l'alanine possèdent toutes une incorporation de tritium significative¹⁰, et ceux avec seulement 2,4 équivalents de HO[•] et un agent de réparation d'activité spécifique moyenne (AS = 344 GBq.mmol⁻¹) (Figure II-14 A.). Ces expériences de détection de radicaux sur une même séquence peptidique semblent reproductibles puisque le même ordre de réactivité est obtenu pour les acides aminés du kemptide précédemment étudié seul (Figure II-13). De même, les deux leucine, ainsi que les deux arginine sont respectivement marquées de manière équivalente.

Il est à noter, qu'après des étapes de mises au point (Annexe V.B.a et b), une étude similaire a été menée en utilisant l'accélérateur linéaire d'électrons comme source de HO[•] (Figure V-10 en annexe V.B.c). Seul le kemptide a été séquencé. Après normalisation, le profil d'incorporation de tritium et l'intensité de marquage présentent la même tendance pour les acides aminés issus des deux échantillons (LINAC ou autoradiolyse de l'eau tritiée). Seules les intensités de marquage des arginine entre les deux échantillons sont un peu différentes (environ 1,5 fois plus de marquage pour les arginine issus de l'échantillon d'autoradiolyse). Ceci peut s'expliquer par l'effet de la normalisation, mais surtout par le temps de réaction de deux minutes dans un cas et de huit heures dans l'autre.

¹⁰ La détection de manière significative, notamment de la glycine pourtant très peu marqué dans l'échelle de réactivité des acides aminés isolés, est en partie due à des méthodes de quantification différentes. Ainsi, le compteur de scintillation liquide statique est 10 fois plus sensible que le détecteur de radioactivité dynamique couplée à l'HPLC.

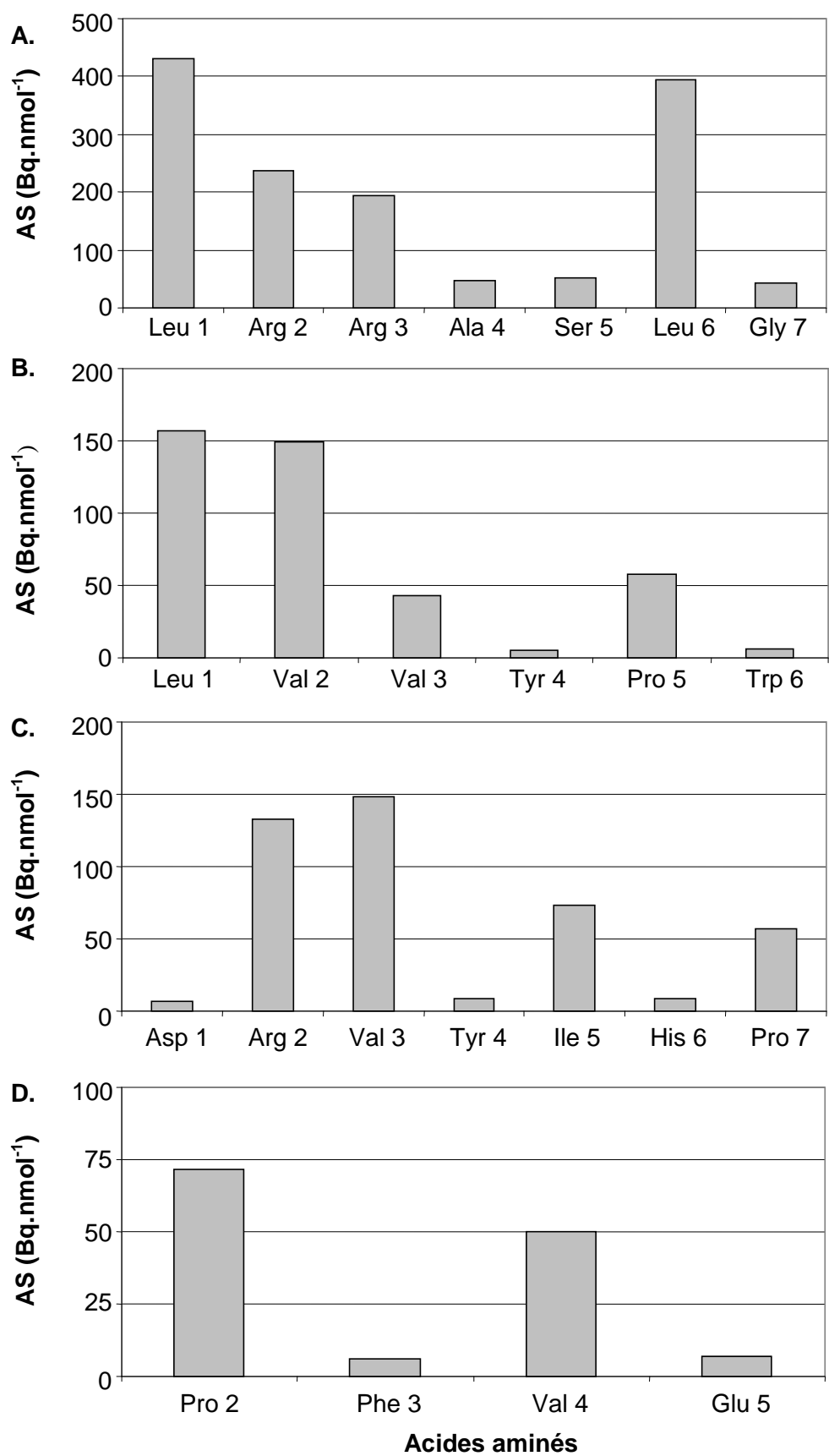


Figure II-14 Activités spécifiques des acides aminés issus des peptides en mélange. A. Kemptide ; B. Leu-Valorphine-Arg ; C. Angiotensine ; D. β-Casomorphine. Conditions expérimentales : 8*50 μM de

peptides ; eau tritiée $18,5 \text{ GBq.mL}^{-1}$ pendant 8h soit $[\text{HO}^\bullet] = 973 \text{ }\mu\text{M}$ cumulée, 2,4 éq.; ^3H -BPASS $740 \text{ }\mu\text{M}$ soit 1,85 éq. ($\text{AS} = 344 \text{ GBq.mmol}^{-1}$) ; Tampon Phosphate 10 mM pH 7,2 ; saturée en N_2O .

Les conditions expérimentales utilisées pour le mélange peptidique issu de l'autoradiolyse de l'eau tritiée correspondent en équivalence¹¹ à environ 5 fois moins de HO^\bullet et de ^3H -BPASS que lors des expériences avec les acides aminés isolés. Afin de rationaliser les résultats obtenus pour comparer l'incorporation en ^3H des acides aminés issus des peptides avec celle obtenue sur les acides aminés seuls, les activités spécifiques sont normalisées sur la leucine la plus marquée ($\text{Leu1}_{\text{kemptide}}$ de la Figure II-14 A.). Les valeurs normalisées sont représentées dans la Figure II-15 et dans la Figure V-11 (annexe V.C).

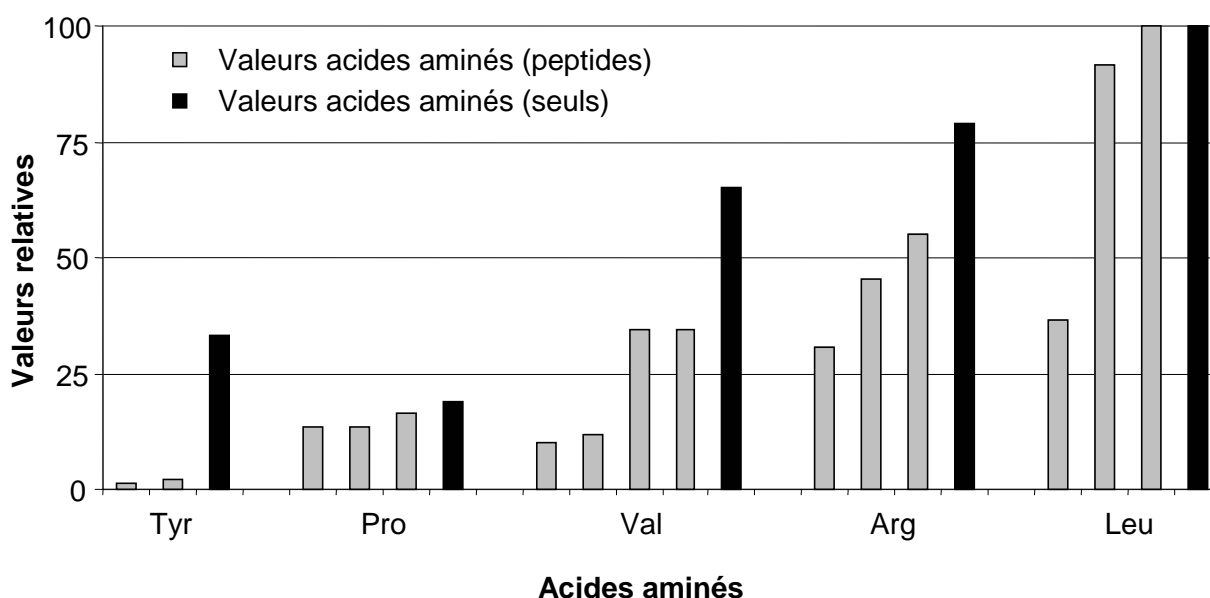


Figure II-15 Activités spécifiques des acides aminés issus des peptides en mélange normalisées sur l'activité spécifique de la leucine la plus marquée, comparées à celles des acides aminés isolés.

Tout d'abord, les quatre acides aminés aromatiques (Trp, Phe, Tyr et His) et les acides aminés chargés négativement (Asp, Glu) présentent une plus faible incorporation de tritium de l'ordre de 20 à 50 fois moins en comparaison avec les acides aminés seuls (Figure II-15 et Figure V-11 en annexe).

¹¹Le nombre d'équivalence en HO^\bullet et en ^3H -BPASS est calculé par rapport au nombre de mole d'acide aminé issu des peptides, et non du nombre de mole de peptide.

Pour leur part, les acides aminés aliphatiques (Leu, Ile, Val, Pro) et un acide aminé chargé positivement (Arg) présentent jusqu'à 7 fois moins d'incorporation en radioactivité (Figure II-15 ; Figure V-11 en annexe). Cependant, après normalisation, une incorporation en ^3H similaire aux acides aminés seuls est observée pour deux leucine, les trois proline et la seule alanine présente (Figure II-15 ; Figure V-11 en annexe). De plus, la glycine et la sérine possèdent relativement 3 fois plus d'incorporation dans le peptide que lorsqu'ils sont sous forme acide aminé libre. Enfin, d'une position sur la séquence peptidique à une autre et d'un peptide à un autre, l'activité spécifique pour un même acide aminé peut ne pas être identique (Figure II-14 ; Figure II-15).

L'ensemble de ces observations montrent que l'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ est fonction à la fois de la réactivité de l'acide aminé, mais aussi de son environnement. Une étude récente a montré pour la première fois que le groupement carboxylate d'un acide aspartique a un pouvoir désactivant à travers la chaîne principale polypeptidique qui influe sur le taux d'oxydation de la leucine située sur un peptide de type D-(G)_n-L (avec n = 0 à 5) [240]. L'effet désactivant est plus fort sur le peptide D-L, et diminue jusqu'à disparaître avec une distance de 15 à 17 liaisons. Cet effet désactivant semble plutôt être un effet inductif qu'un effet stérique. Dans notre étude, la valine issue de trois peptides (Figure II-14 B., C. et D.) présente des activités spécifiques différentes selon qu'elle soit dans la séquence peptidique à côté de résidus chargés négativement, positivement, aliphatiques et/ou aromatiques. Sur la Figure II-14 B., dans la séquence Leu-Val-Val-Tyr, la seconde valine présente une activité spécifique 3,5 fois plus petite que la première valine. Il est difficile de tirer des conclusions sur l'effet de tel ou tel résidu sur ses voisins. Des études consistant à tester un nombre important de combinaisons seraient nécessaires pour appréhender les effets de charges, d'encombrement et des extrémités N et C-terminales sur la réactivité de tous les acides aminés.

De plus, les effets de marquage pourraient potentiellement être influencés par la nature de notre agent de réparation (^3H -BPASS) qui présente une charge négative et un noyau aromatique. Des interactions de type ionique avec les résidus chargés positivement ou de répulsion avec ceux chargés négativement pourraient jouer sur l'incorporation de tritium. Il en est de même des interactions de type « π -stacking » du composé aromatique ^3H -BPASS avec les noyaux aromatiques de Trp, Phe ou de Tyr. L'orientation des deux molécules l'une par rapport à l'autre, et notamment la position du C' et de la tête phosphorée de l'agent présentant le ^3H échangeable, doit être importante pour le processus d'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$.

En conclusion générale de ce chapitre, notre méthode, qui utilise l'atome de tritium, permet de détecter et de quantifier les radicaux formés sur tous les acides aminés isolés à l'exception de la glycine et de la sérine. La détection de radicaux sur 18 acides aminés sur 20 est une avancée importante en comparaison avec la méthode d'Anderson qui utilise le deutérium et un autre agent de réparation. En effet, sa méthode permet seulement de détecter des radicaux sur 12 acides aminés parmi les 20 communément retrouvés dans les protéines.

Les expériences menées montrent aussi que la détection de radicaux sur de petits peptides est possible. Notamment, une incorporation significative de tritium a été observée sur la sérine et la glycine non détectées précédemment. Cette observation suggère que notre méthode est capable de détecter des radicaux sur tous les acides aminés. Cependant, sur certains acides aminés, comme les aromatiques et ceux chargés négativement, le marquage radioactif dans les peptides a été faible. Afin d'améliorer notre méthode, la synthèse de nouveaux agents de réparation tritiés pourrait être envisagée dans le but de mieux incorporer du tritium par exemple sur les acides aminés aromatiques dans les séquences protéiques.

De plus, les premiers résultats sur de petits peptides non structurés montrent qu'un acide aminé identique, situé à différents endroits d'une séquence peptidique ou sur différents peptides, ne possède pas forcément la même activité spécifique. Ceci suggère que les résidus situés de part et d'autre de l'acide aminé étudié influent sur son incorporation de tritium. Dans une protéine, l'interprétation de tels phénomènes serait très compliquée car il y aurait en plus, des effets de structures et des effets dans l'espace. Des études approfondies consistant à tester différentes combinaisons pour un même acide aminé seraient nécessaires pour mieux comprendre et rationaliser ces effets de voisins. Cependant, un des premiers essais menés au laboratoire précédant mon arrivée a montré que la méthode d'échange $^1\text{H}/^3\text{H}$ était capable d'incorporer de manière satisfaisante du tritium sur une protéine, l'apomyoglobine. Cependant, la cartographie de la surface de cette protéine n'avait pas été finalisée. En raison du manque d'information concernant ces effets de voisins, nous n'avons pas entrepris de réaliser la cartographie de surface de protéine.

Afin de s'affranchir de ce problème, nous avons choisi d'appliquer cette méthode de détection et de quantification de radicaux sur les protéines en étudiant les interactions protéine-protéine. Le prochain chapitre de cette thèse porte sur la caractérisation de l'interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et le fragment 122-135 de l'histone H3.

III Application à la caractérisation de l'interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et un fragment de l'histone H3

Le chapitre I présentait l'ensemble des techniques récentes caractérisant les interactions protéine-protéine à divers niveaux de résolution, allant de la détection d'une zone d'interaction, à celle des acides aminés réellement impliqués, jusqu'à la résolution atomique. Ce chapitre discute de l'application de notre méthode de détection et de quantification des radicaux pour caractériser les interactions protéine-protéine. Plus particulièrement, nous étudierons et déterminerons les acides aminés impliqués dans l'interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et le fragment 122-135 de l'histone H3. Cette étude montrera que notre approche permet d'obtenir une résolution au niveau de l'acide aminé en détectant et en quantifiant les radicaux formés sur les chaînes latérales des acides aminés des protéines.

III.A Méthode de caractérisation des interactions protéine-protéine

Le principe général de la méthode est représenté dans la Figure III-1. Une protéine est soumise à l'attaque de radicaux hydroxyle produits par radiolyse de l'eau. Les HO[•], générés à proximité de la protéine, arrachent les hydrogènes des acides aminés exposés au solvant. Ces radicaux carbo-centrés (C[•]) ainsi formés sont ensuite réparés par l'incorporation d'un tritium fourni par un agent donneur de tritium (³H-BPASS). Cette réaction est donc basée sur l'échange entre un hydrogène et un tritium en créant une liaison stable de type C-³H. Ainsi, l'atome de tritium incorporé, élément facilement détectable et quantifiable, peut être relié à l'accessibilité à l'eau de chaque acide aminé de la protéine. Lors de l'application de cette méthode à la caractérisation des interactions protéine-ligand, le même procédé est appliqué à chaque partenaire seul puis en complexe. Dans le complexe, les acides aminés de la zone d'interaction devraient être moins exposés au solvant et seront donc moins accessibles à l'attaque des radicaux hydroxyle. Ces acides aminés seront alors identifiables par la présence d'une plus faible incorporation de tritium en comparaison avec ceux de la protéine seule.

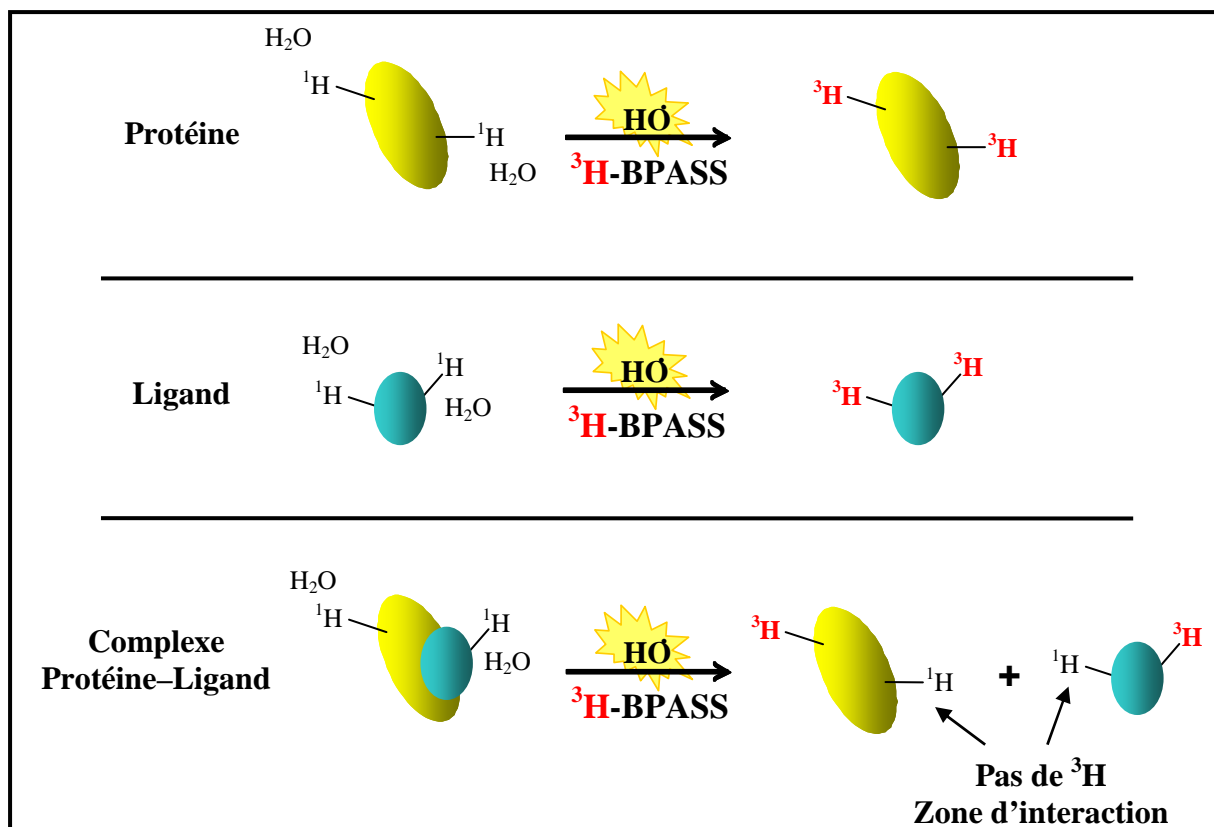


Figure III-1 Représentation schématique de la méthode de caractérisation des interactions protéine-ligand.

Nous avons appliqué cette méthode à la caractérisation de l'interaction entre la protéine humaine hAsf1₁₋₁₅₆ et un fragment de l'histone H3.

III.B La protéine Asf1

La protéine Anti-Silencing Factor 1 (Asf1) a été découverte en 1997 pour son rôle dans la régulation de la transcription des gènes (« silencing ») [241]. Depuis, de nombreuses études ont été menées et ont pu mettre en évidence des fonctions liées notamment à l'assemblage et au désassemblage des nucléosomes. L'ensemble de ces travaux est résumé dans la récente revue *Chromosoma* [242]. La protéine Asf1 a notamment un rôle important de chaperon d'histones H3/H4, de remodelage de la chromatine, de réponse cellulaire au dommage de l'ADN et un rôle dans la régulation de l'expression des gènes. Cette protéine a donc une fonction centrale dans des événements cellulaires essentiels tels que la réplication, la transcription et la réparation de l'ADN [242]. Tous ces événements sont intimement liés au cycle d'assemblage et de désassemblage du nucléosome.

III.B.1 Le nucléosome

Les mammifères possèdent un génome comprenant 2 à 3 milliards de bases qui code pour environ 30 000 gènes. Ainsi l'ADN humain déplié est long d'environ deux mètres, mais une fois condensé sous forme de chromatine, il peut loger dans le noyau d'une cellule [243]. Le nucléosome, unité de base retrouvée chez tous les eucaryotes, est composé d'un octamère d'histones autour duquel s'enroule l'ADN qui permet l'organisation et la compaction de l'ADN sous forme de chromatine.

Cette unité élémentaire de la chromatine est formée de deux copies de chacune des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce cœur d'histones est composé de l'hétérotétramère (H3/H4)₂ flanqué de part et d'autre de l'hétérodimère H2A/H2B autour duquel s'enroule 146 paires de bases (pb) d'ADN pour former une superhélice gauche de 1,7 tours. La structure cristallographique de cet assemblage supramoléculaire résolue à 2,8 Å est représentée dans la Figure III-2 [244].

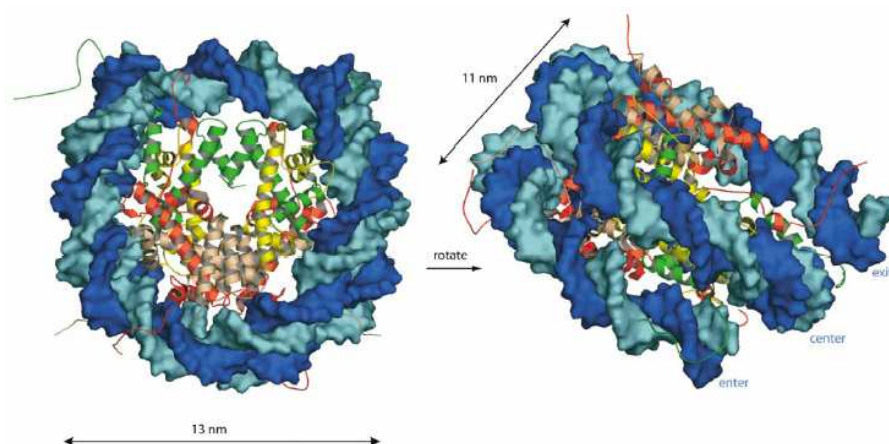


Figure III-2 Structure atomique du nucléosome (Résolution de 2,8 Å). Chaque brin d'ADN est représenté par une variante de bleu. Chaque type d'histone possède la couleur correspondante des Figure III-3 A et B. Figures issues de [243].

Les histones qui forment l'octamère sont des protéines d'environ 120 résidus très conservées dans tous les organismes eucaryotes. Chaque histone possède un repliement caractéristique appelé « histone fold » sous forme de 3 hélices α (α_1 , α_2 et α_3) qui sont impliquées dans les interactions de type histone-histone et histone-ADN (Figure III-3). Ces histones possèdent une queue C-terminale et une queue N-terminale non structurées en solution. Les histones sont le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles ou de

marques épigénétiques qui codent pour réguler l'accessibilité de l'ADN à différents métabolismes cellulaires (III.B.3).

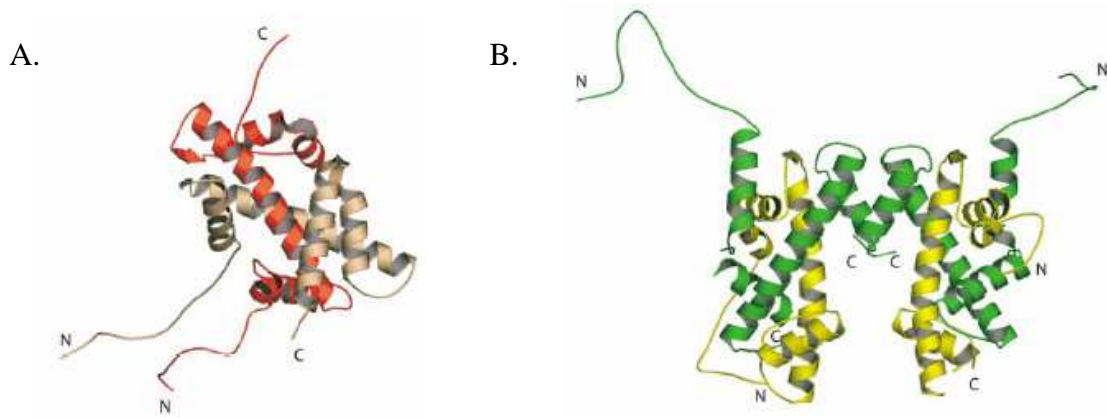


Figure III-3 Structures atomiques des composants du cœur d'histones : A. Dimère H2A/H2B avec H2A en rouge et H2B en rose ; B. Tétramère (H3/H4)₂ avec H3 en vert et H4 en jaune. Figures issues de [243].

Le tétramère (H3/H4)₂ du cœur octamérique est lui-même formé de deux dimères (H3/H4) qui interagissent de manière symétrique par un faisceau d'hélices entre H3 et H3'. Le dimère (H2A/H2B) interagit de part et d'autre du tétramère en formant de même un faisceau d'hélices entre H2B et H4. En plus d'interagir avec H4, l'histone H3 est en contact direct avec H2A. Le dimère H2A/H2B est positionné de telle manière que les deux molécules H2A et H2A' interagissent entre elles [243]. Une cinquième histone H1, appelée « histone linker », peut s'associer au nucléosome et verrouiller l'ADN autour du cœur du nucléosome formé.

Les nucléosomes s'agencent tout au long de l'ADN de manière répétée, avec des espaces de 10 à 60 pb, pour former ce que l'on appelle le nucléofilament (10 nm). Cette structure s'enroule, selon un modèle vraisemblablement en zig-zag, pour donner une fibre chromatinienne de 30 nm de diamètre stabilisée par l'histone H1. Lors de l'interphase, des degrés de compaction de la chromatine encore plus élevés sont atteints (100 à 400 nm), avec un maximum de compaction lors de la formation de chromosome en métaphase. Ce phénomène est appelé remodelage de la chromatine (Figure III-4).

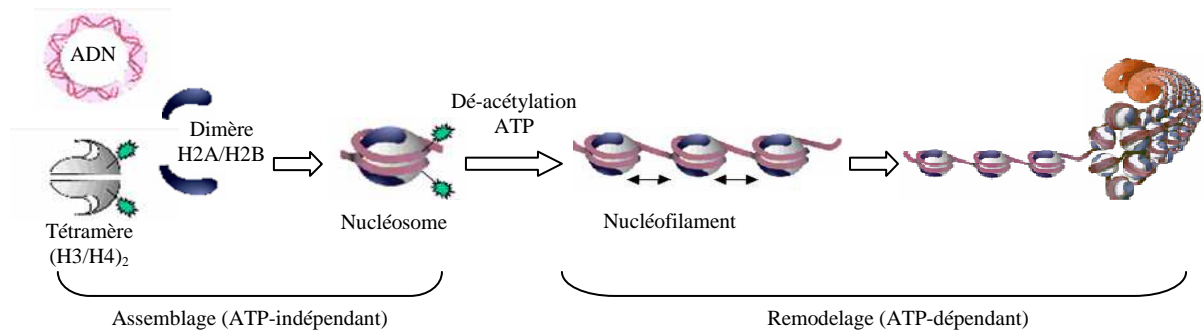


Figure III-4 Représentation des différentes étapes du remodelage de la chromatine (en vert : acétylation).

La compaction de la structure chromatinienne a pour fonction de diminuer l'accessibilité de certaines protéines aux séquences de bases nucléotidiques, pour réguler des événements du cycle cellulaire et de transcription. Ainsi, la chromatine est une structure dynamique qui alterne les phases de repliement/dépliement grâce à de nombreux facteurs [245]. Ces protéines peuvent intervenir à différents niveaux lors de la formation du nucléosome et/ou dans le processus de compaction de la chromatine. L'assemblage du nucléosome nécessite l'intervention de plusieurs protéines chaperons d'histones.

III.B.2 Rôles de la protéine Asf1

a. Rôle dans l'assemblage et le désassemblage du nucléosome

Les chaperons d'histones sont des protéines qui recrutent les histones et les déposent sur l'ADN pour former les nucléosomes. Leur rôle est de préserver la forme active des histones, en évitant leur déstructuration, les mauvais repliements et les interactions non souhaitées avec d'autres protéines. Une fois le nucléosome formé, les protéines chaperons d'histones sont libérées dans le milieu cellulaire et peuvent recruter d'autres histones.

Ces protéines chaperons agissent notamment lors de la réplication de l'ADN où intervient le désassemblage transitoire de la chromatine. En effet, lors du passage de la fourche de réplication, les nucléosomes se désassemblent libérant les dimères H2A/H2B et le tétramère (H3/H4)₂ pour permettre à la polymérase de synthétiser les nouveaux brins d'ADN. Les protéines chaperons déposent alors sur l'ADN nouvellement répliqué les histones parentales libérées ou les histones nouvellement synthétisées.

La protéine Asf1 est une protéine chaperon qui forme le complexe trimérique R-CAF (Replication-Coupled Assembly Factor) en s'associant avec le dimère H3/H4. Elle agit en coopération avec une autre protéine chaperon CAF-I (Chromatin Assembly Factor-I), et sont toutes les deux recrutées au niveau du site de polymérisation [246]. La protéine Asf1 permet ainsi de déposer le dimère (H3/H4) acétylé sur l'ADN nouvellement répliqué (Figure III-5). Lors de la réplication, c'est le variant d'histone H3.1 qui est déposé chez les mammifères [247]. La protéine chaperon NAP-1 (Nucleosome Assembly Protein-1) complète ensuite le nucléosome en déposant les deux dimères H2A/H2B.

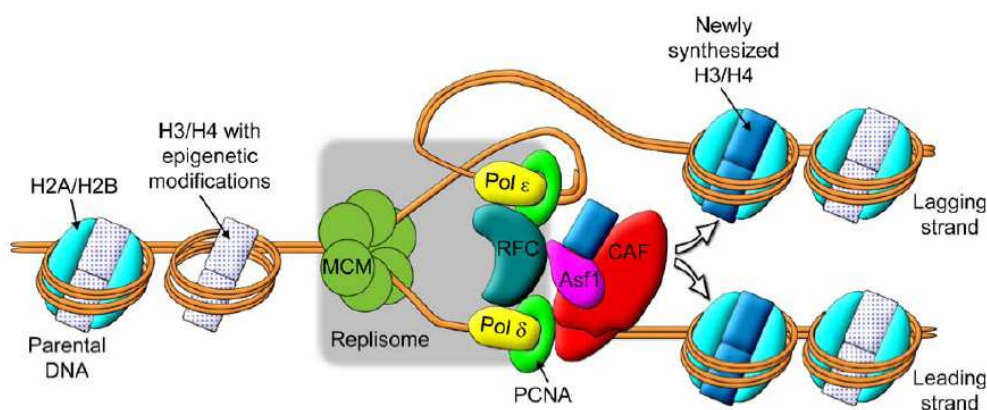


Figure III-5 Représentation schématique de la réplication de l'ADN. Figure issue [242].

Les protéines Asf1 et CAF-I sont connues pour avoir un rôle synergique pour reconstituer le nucléosome *in vitro*, mais peuvent également agir en parallèle de manière indépendante. Dans la levure *S. cerevisiae*, l'absence de l'une ou de l'autre, ou des deux n'empêche pas l'assemblage des nucléosomes. La délétion du gène d'Asf1 n'est pas létale et provoque seulement une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation des dommages de l'ADN. Ces observations suggèrent l'existence de chemins parallèles faisant intervenir des protéines chaperons redondantes, inconnues à ce jour, qui permettraient de relayer le rôle d'Asf1 ou de CAF-I si l'une d'entre elles venait à manquer.

La protéine Asf1 en coopération avec la protéine Hir (Histone Regulation) (Hir1p et Hir2p chez la levure, ou HirA chez l'homme) assemble également les nucléosomes de manière indépendante de la réplication. Dans ce cas là, l'histone H4 est associée au variant d'histone H3.3. Cette voie d'assemblage du nucléosome intervient lors de la transcription d'un gène ou lors de la réparation de l'ADN [247-249].

Les récentes études structurales indiquent que la protéine Asf1 ne peut interagir avec H3/H4 que sous sa forme dimérique et pas sous sa forme tétramérique. En solution la forme tétramérique est la plus stable. Cependant, des données biochimiques obtenues par immunoprécipitation, par densitométrie, ou en co-exprimant Asf1, H3 et H4, indiquent que Asf1 recrute H3/H4 sous forme de dimère avec une stoechiométrie de 1/1/1 [247, 250-252]. De plus, la structure cristallographique du nucléosome montre que les deux histones H3 et H3' interagissent ensemble dans l'octamère au niveau de l'hélice α_3 , ainsi que le domaine C-terminal de H4 avec l'histone H₂A [244]. Ce mode d'exclusion mutuelle entre H3/H4-H3/H4 et Asf1-H3/H4 suggère une activité liée à Asf1 qui dissocierait le tétramère en libérant le dimère recruté par Asf1. En utilisant la technique de diffraction de la lumière, Natsume *et al.* confirment ce nouveau rôle d'Asf1 [253].

La protéine Asf1 possède aussi une fonction de stockage des dimères H3/H4 nouvellement synthétisés, dans le but de protéger la cellule de l'effet toxique induit par une trop forte concentration en histone H3 [247, 251].

Asf1 est également impliquée dans le désassemblage de la chromatine au niveau des promoteurs durant l'activation de la transcription, et du désassemblage et réassemblage de la chromatine lors de l'élongation de la transcription [254-256].

Ainsi, l'un des premiers grands rôles de la protéine Asf1, chaperon des histones H3/H4, est de permettre l'association et la dissociation des nucléosomes tout au long du cycle cellulaire en s'associant avec les protéines Hir et CAF-I.

b. Rôle dans les voies de signalisation des dommages de l'ADN

La protéine Asf1 est également impliquée dans la réponse cellulaire au dommage de l'ADN. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, dans des conditions normales de croissance, Asf1 est liée à la protéine Rad53, une kinase impliquée dans le contrôle des dommages de l'ADN (Figure III-6 (A)) [257, 258]. Suite à un stress génotoxique, la protéine Rad53 est phosphorylée par d'autres kinases (Mec1, Tel1) et par autophosphorylation. Asf1 et Rad53 sont alors dissociées [259, 260]. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer le rôle de cette interaction. La première hypothèse propose qu'Asf1 interagirait avec Rad53 pour permettre le recrutement du complexe au niveau du site de lésion de l'ADN. La

phosphorylation et l'activation de Rad53 libéreraient Asf1 dans une forme correcte pour lier le dimère H3/H4 et d'autres partenaires potentiels.

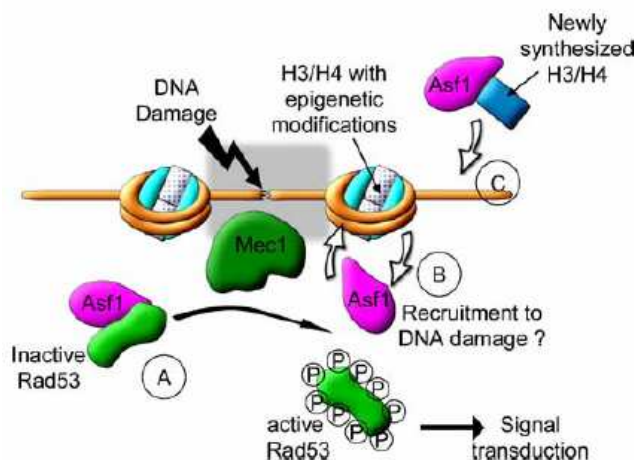


Figure III-6 Rôle de Asf1 dans la réponse cellulaire au dommage de l'ADN dans *S. Cerevisiae*. Figure issue de [242].

A proximité des sites de lésions de l'ADN, Asf1 pourrait avoir deux rôles. Elle pourrait enlever les histones H3/H4 de l'ADN endommagé pour permettre une meilleure accessibilité aux systèmes de réparation (Figure II-6 (B)) et/ou permettre de réassembler les nucléosomes suite à la réparation de l'ADN (Figure III-6 (C)) [242]. La seconde hypothèse propose qu'Asf1 servirait à maintenir la protéine Rad53 dans sa forme inactive de manière à éviter l'activation non désirée et dommageable de la kinase. Toutefois, aucun des mécanismes proposés n'a été encore validé expérimentalement.

Des travaux très récents ont montré que la protéine Asf1 contribue aussi à la résistance de *S. cerevisiae* au stress génotoxique en permettant l'acétylation de K₅₆ de l'histone H3 par l'histone acétylase Rtt109 [242, 261, 262]. Cependant, le rôle de cette acétylation pour la résistance au stress génotoxique n'est pas établi à ce jour.

Dans les cellules humaines, le rôle d'Asf1 dans la résistance aux dommages de l'ADN implique très probablement des mécanismes différents de ceux décrits dans la levure *S. cerevisiae*. En effet, aucune interaction n'a été observée entre Chk2, l'orthologue de mammifère de Rad53, avec la protéine humaine hAsf1, et la lysine K₅₆ n'est pas acétylée ou très peu [251, 263, 264]. Cependant, hAsf1 pourrait jouer un rôle dans la réponse cellulaire au dommage de l'ADN dans les cellules de mammifère, par l'intermédiaire des kinases Tlk1 et

Tlk2 récemment mises en cause dans la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire [265-267]. En conditions normales, hAsf1 est phosphorylée, mais lors d'un stress génotoxique les kinases Tlk1 et Tlk2 sont elles mêmes phosphorylées et inactivées par la kinase Chk1, empêchant ainsi la phosphorylation de hAsf1. Toutefois, les mécanismes impliquant Asf1 dans la réponse cellulaire au stress génotoxique chez les mammifères ne sont pas décrits actuellement.

c. Rôle dans la régulation de la transcription des gènes (silencing)

Dans certaines zones des chromosomes et au cours du cycle cellulaire, la chromatine est tour à tour plus ou moins condensée. Des zones actives sous forme d'euchromatine permettent la transcription des gènes, alors que des zones plus compactes, sous forme d'hétérochromatine, empêchent tout phénomène de transcription, ce qu'on appelle le « silencing ». Chez *S. cerevisiae*, la surexpression ou la délétion de la protéine Asf1 provoque la répression du « silencing » dans certaines régions (télomère, locus de type sexuel HMR et HML) et permet ainsi l'activation de la transcription des gènes [241, 268].

La protéine Asf1 possède donc un rôle dans l'assemblage et la régulation de l'hétérochromatine. Des expériences de mutation des gènes codant pour les protéines chaperon d'histone *asf1*, *hir* et *cac*, ont permis de montrer que CAF-I d'une part, et Hir/Asf1 d'autre part, permettent de réguler le phénomène de « silencing » indépendamment et en parallèle (Figure III-7 (A)). L'absence de ces trois protéines en même temps peut interférer avec le « silencing » en fragilisant la structure de la chromatine réprimée [269]. *In vitro*, le complexe ternaire Asf1/Hir/(H3/H4) est suffisant pour permettre l'assemblage du nucléosome et ce indépendamment de la réplication de l'ADN. Ce phénomène peut donc contribuer à la formation de la chromatine transcriptionnellement silencieuse dans la levure. Cependant, *in vivo*, d'autres facteurs inconnus semblent nécessaires pour permettre cette fonction [242].

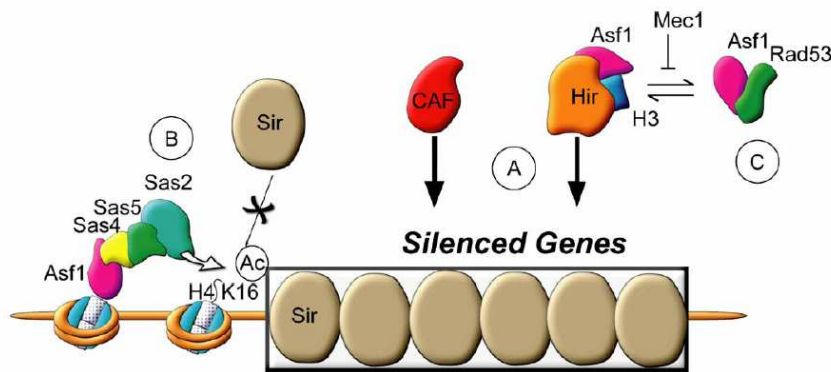


Figure III-7 Représentation de la régulation du phénomène de « silencing » par trois mécanismes faisant intervenir Asf1 avec Hir (A), le complexe Sas (B), et la protéine Rad53 (C) dans le rôle de séquestreur de Asf1. Figure issue [242].

Un autre mécanisme fait intervenir le complexe ternaire Sas. Ce complexe possède une activité Histone acétyl transférase (HAT), et peut se lier avec Asf1 par une de ses sous-unités [270]. L'activité HAT de Sas2 permet d'acétyler la lysine 16 de l'histone H4, ce qui empêche les protéines SIR d'interagir avec la chromatine (Figure III-7 (B)). Les complexes protéiques SIR sont nécessaires pour former l'hétérochromatine transcriptionnellement silencieuse en venant se polymériser sur les nucléosomes. Le complexe Sas–Asf1 présente donc une voie alternative pour le phénomène de « silencing » et permet de délimiter les zones entre la chromatine normale et celle réprimée.

Récemment, Sharp *et al.* ont proposé un autre mécanisme faisant intervenir la protéine Rad53 [249]. En partant du fait que Asf1 lie soit Rad53 soit (H3/H4), ils ont montré, par des études de délétion du gène RAD53 et de mutation de *cac1Δ*, que Asf1 ainsi libéré pouvait compenser l'absence du chemin impliquant CAF-I dans le silencing télomérique. Ainsi, Rad53 phosphorylée par Mec1 relâcherait Asf1 qui recruterait (H3/H4) et interagirait avec Hir pour jouer un rôle de régulation dans le « silencing » des gènes situés dans le télomère (Figure III-7 (C)) [242].

Dans les cellules de mammifères, Asf1a¹² en interaction avec HirA, orthologue des protéines de levure correspondant aux séquences fusionnées Hir1p et Hir2p, est aussi

¹² Il existe deux isoformes de la protéine Asf1 chez plusieurs organismes, et notamment chez l'homme avec Asf1a et Asf1b.

impliquée dans le « silencing » en participant à maintenir l'état de sénescence¹³ des cellules en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire [271].

d. Rôle dans la répression de gène d'histone

Dans la levure, la protéine Asf1 et les protéines Hir coopèrent pour réprimer les promoteurs des gènes de 6 des 8 histones du cœur ([272, 273]. Cette répression intervient en dehors de la phase S du cycle cellulaire et lorsque la réplication est inhibée. De plus, Asf1 semble aussi impliquée dans l'activation de l'expression de ces gènes. Rad53 possède aussi un rôle dans la régulation de la quantité d'histone dans la cellule en provoquant la dégradation des histones libres, donc non recrutées par Asf1 (Figure III-8).

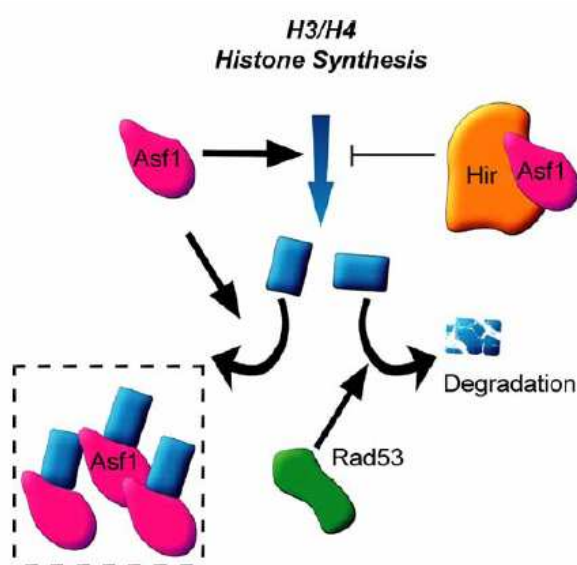


Figure III-8 Rôle de Asf1, Hir et Rad53 dans la régulation du taux d'histones dans la cellule. Figure issue de [242].

La protéine chaperon d'histones Asf1 a une grande importance biologique car elle est impliquée, entre autres, dans l'assemblage et le désassemblage de nucléosomes, la régulation de la transcription des gènes et un rôle dans le cycle de réponse cellulaire au dommage à l'ADN. L'ensemble de ces activités nécessite la présence de partenaires d'interaction comme CAF-I, Hir, RFC, Rad53, et bien d'autres représentés dans la Figure III-9.

¹³ La sénescence cellulaire correspond à l'arrêt du cycle cellulaire de manière irréversible afin de limiter la prolifération des cellules endommagées.

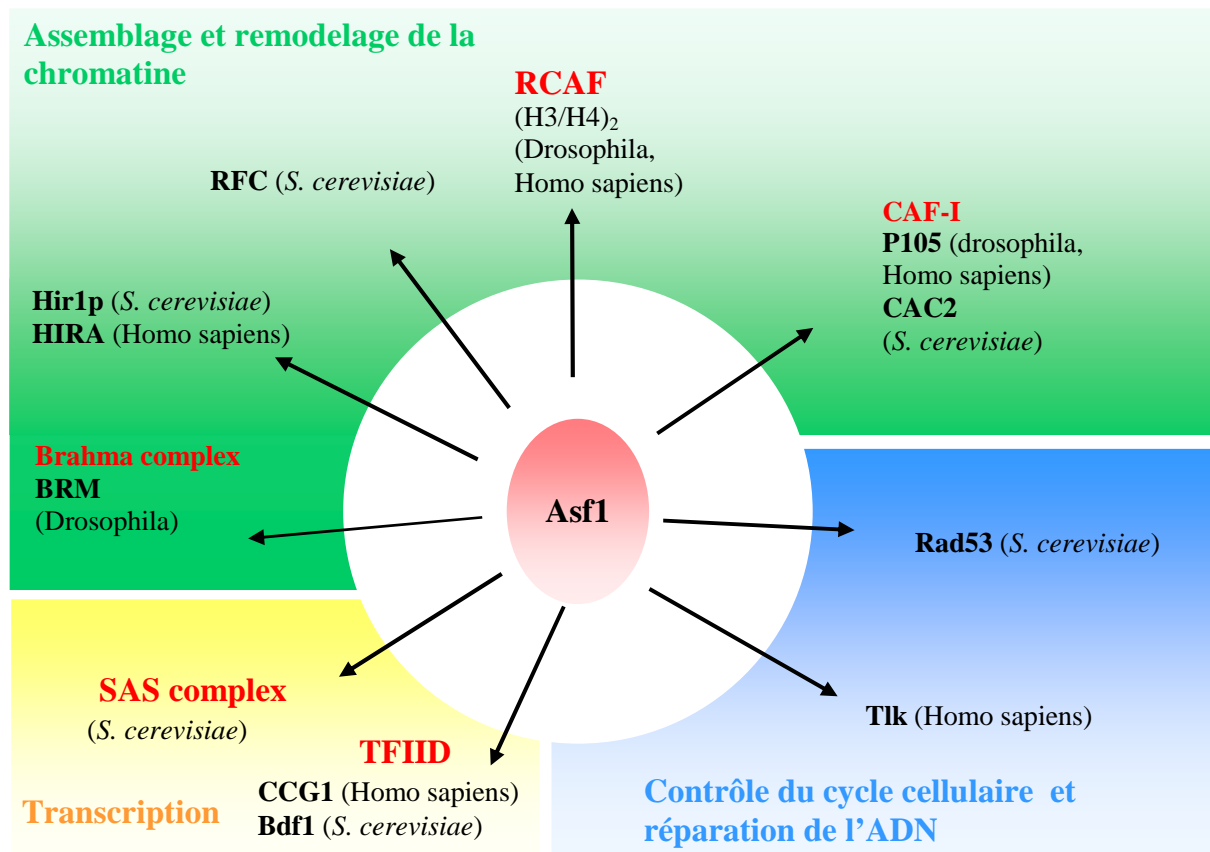


Figure III-9 Les trois grands rôles de la protéine Asf1 et ses partenaires d'interactions.

Ainsi, la protéine Asf1 semble être au croisement de mécanismes cellulaires interconnectés autour d'un rôle majeur dans le remodelage de la chromatine. Ces fonctions centrales sont directement liées à son rôle de chaperon des histones H3/H4, *via* notamment l'interaction privilégiée avec H3. Les modifications post-traductionnelles et/ou les variants de H3 jouent eux même un rôle dans ces phénomènes liés au remodelage de la chromatine.

III.B.3 L'histone H3

a. Les modifications post-traductionnelles

Chaque histone présente une queue N-terminale de 20 à 35 résidus riches en acides aminés basiques et qui s'étend vers la surface du nucléosome. Ces queues chargées positivement sont connues pour participer à la compaction de la chromatine en interagissant avec l'ADN chargé négativement et avec le cœur des histones du nucléosome. Ces queues N-terminales peuvent présenter diverses modifications covalentes post-traductionnelles réversibles telles que la méthylation de l'arginine, la méthylation, l'acétylation,

l'ubiquitinylation et la sumoylation de la lysine, et la phosphorylation de la sérine et de la thréonine. Longtemps, il a été suggéré que ces modifications altéraient la structure de la chromatine en influençant les contacts ADN–histone et histone–histone. Par exemple des acétylations et phosphorylations neutralisent les charges positives de la queue N-terminale facilitant ainsi le remodelage de la chromatine [274, 275]. Cependant, la complexité et la grande diversité des phénomènes biologiques qui sont associés à différentes combinaisons de modifications covalentes suggèrent l'existence d'un « code histone », lu par des protéines spécifiques qui le traduisent en un événement particulier [276, 277]. Ce code est complexe car par exemple un même résidu peut être méthylé jusqu'à 3 fois et une modification préexistante peut affecter les modifications suivantes. Ces modifications affectent par exemple la liaison de facteurs de transcription sur l'ADN ou provoquent des changements de structure de la chromatine à l'échelle du génome. Beaucoup de modifications sont observées sur les queues N-terminales, mais de plus en plus de modifications sont détectées sur les domaines centraux des histones du nucléosome. Il est à noter qu'une seule substitution sur un de ces résidus modifiables peut entraîner des effets beaucoup plus dramatiques (que lors d'une mutation sur la queue N-terminale) sur la transcription, la réparation des dommages de l'ADN, la structure de la chromatine, l'assemblage de la chromatine et le « silencing » des gènes de l'hétérochromatine [278].

L'histone H3 est notamment le siège de modifications post-traductionnelles sur la queue N-terminale et sur le cœur de la protéine (Figure III-10).



Figure III-10 Sites potentiels (liste non exhaustive) des modifications post-traductionnelles observées sur l'histone H3. Me, méthylation ; Ac, acétylation ; P, phosphorylation [279]

Ces modifications sur H3 vont notamment avoir des rôles variés comme la déposition de l'histone sur l'ADN, le « silencing », l'activation, l'élongation ou la répression de la transcription, la réparation de l'ADN, la réplication de l'ADN ou encore l'inactivation du chromosome X [279]. Par exemple, l'état de méthylation de la lysine 4 (K_{4Me}) de l'histone H3 va activer ou non la transcription. Une diméthylation peut être retrouvée à la fois sur un gène inactif et actif, alors que la triméthylation est un marqueur spécifique de gène

transcriptionnellement actif [280]. K_{4Me} peut aussi être impliquée dans le phénomène de silencing de l'ADNr [281].

Un autre exemple de modification, cette fois ci sur le cœur de l'histone H3, est l'acétylation de la lysine 56 (K_{56Ac}) qui intervient notamment lors de la phase S de la mitose, de la réparation des dommages de l'ADN et de la phase S préméiotique chez la levure *S. cerevisiae*. La protéine Asf1 est nécessaire pour permettre cette acétylation et semble avoir un rôle dans la présentation de K_{56Ac} de l'histone H3 aux acétyltransférases (HAT) [261]. Ce cycle de régulation par les phénomènes d'acétylation et de désacétylation de K₅₆ a un impact important sur la capacité des cellules à survivre suite à l'arrêt de la fourche de réplication causée par une lésion de l'ADN [262, 282].

De nombreuses autres modifications engendrant divers effets biologiques existent [278, 279, 283].

b. Les variants d'histones

Il existe aussi différents variants d'histones (à l'exception actuellement de H4), qui, à l'instar des modifications post-traductionnelles, sont associés à divers phénomènes biologiques tels que l'activation de la transcription, le « silencing » de gène, la formation de centromère et les dommages à l'ADN. Généralement, ces variants sont associés à une protéine chaperon spécifique qui les dépose sur l'ADN, pour réaliser une fonction unique et sont localisés dans une zone donnée de l'ADN [284].

Chez les mammifères, l'histone H3 possède 5 variants connus à ce jour dont la séquence peut être différente sur la queue N-terminale (CENP-A) ou différer de seulement quelques résidus (H3.1, H3.2, H3.3 et H3.1t) (Figure III-11).

	24	31	71	87-90	96	98	111
H3.1	A	A	V	SAVM	C	A	A
H3.2	A	A	V	SAVM	S	A	A
H3.3	A	(S)	V	AAIG	S	A	A
H3.1t	V	A	M	SAVM	C	S	V
CENP-A	<div> <div>7</div> <div>(S)</div> </div>						

Figure III-11 Séquence de différents variants d'histones [284].

Par exemple, les centromères de mammifères contiennent un variant d'histone H3 appelé CENP-A qui est essentiel à la fois dans la fonction et l'assemblage du centromère. Il présente une queue N-terminale où il n'y a pas les sites de phosphorylation et d'acétylation typiquement observés sur l'histone H3 normale. Les CENP-A ne sont donc pas présents dans les régions transcriptionnellement actives. Ainsi, ce variant CENP-A aide à maintenir une structure chromatinienne condensée et inactive au niveau du centromère [279]. Le variant H3.1 est quant à lui spécifiquement déposé par CAF-I et Asf1 lors de la réplication de l'ADN, alors que H3.3 est déposé indépendamment de la réplication par Hir et Asf1 [247].

Ainsi, les variants d'histones et les modifications post-traductionnelles jouent des rôles essentiels dans la régulation et le contrôle de processus liés à l'ADN dans le noyau. Ces modifications vont être reconnues spécifiquement par des enzymes ou protéines qui vont moduler l'état de condensation de la chromatine. Ces variants et ces modifications permettent le déroulement correct de phénomènes importants tels que la réplication, la transcription, le « silencing » et la réparation de l'ADN. L'une des interactions privilégiées implique la protéine Asf1 et le dimère H3/H4 dont la structure a été résolue récemment.

III.B.4 La structure du complexe Asf1–H3/H4

a. Séquence primaire de Asf1

La séquence de la protéine Anti-Silencing Factor 1 (Asf1) est très conservée chez tous les organismes eucaryotes avec notamment un domaine N-terminal conservé et une partie C-terminale variable. Chez certaines levures, l'extrémité C-terminale est très riche en groupements aspartate et glutamate formant des queues caractéristiques de types poly Asp/Glu (D/E). Ce type d'extrémité C-terminale est commun à plusieurs protéines chaperons d'histones. En revanche, elle n'existe pas dans les deux isoformes de la protéine humaine Asf1 (hAsf1a et hAsf1b). Par ailleurs, la partie C-terminale de hAsf1a est très riche en résidus phosphorylables de type sérine et thréonine. Dans de nombreuses études *in vivo*, il apparaît que la queue C-terminale n'est pas indispensable pour de nombreuses fonctions de Asf1.

b. Structures de hAsf1 et de ScAsf1

Les structures du domaine N-terminal de ScAsf1₁₋₁₅₅ et de hAsf1a₁₋₁₅₆ libres ont été obtenues par cristallographie par diffraction de rayons X à une résolution de 1,5 Å et par

RMN [285, 286]. Ce domaine très conservé (58 % d'identité entre ScAsf1 et hAsf1) se structure selon un repliement caractéristique de type immunoglobuline, correspondant à un domaine allongé de type sandwich en dix feuillets β avec notamment deux petites hélices α sur des boucles reliant les brins β . La superposition des deux structures obtenues chez l'homme et la levure montre seulement deux différences majeures au niveau des boucles A₄₈-Y₅₃ et N₈₀-G₉₁ reliant respectivement les brins β_4 - β_5 et β_6 - β_7 (Figure III-12). Ce sont les deux zones parmi les moins conservées (seulement 24 % d'identité) [286].

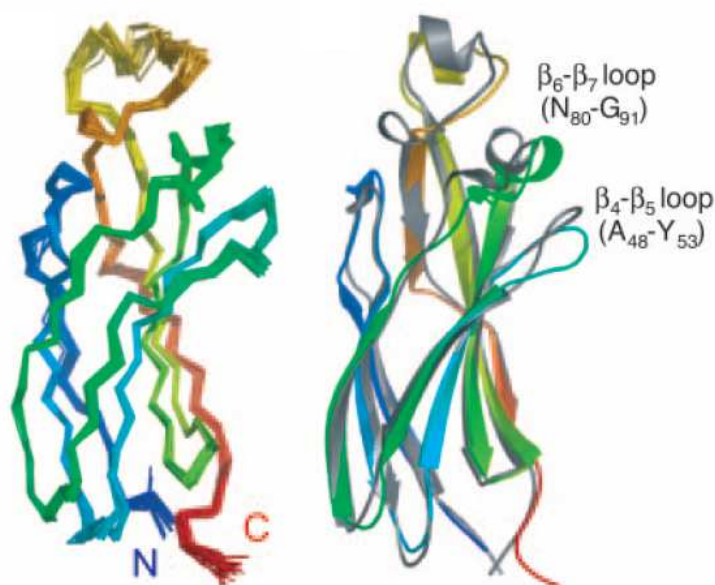


Figure III-12 A. Les 20 meilleures structures obtenues pour le domaine N-terminal très conservé de hAsf1₁₋₁₅₆. B. Superposition des deux structures obtenues du domaine N-terminal de ScAsf1₁₋₁₅₅ et hAsf1₁₋₁₅₆ (généralisé par PYMOL, Delano Scientific, South San Francisco, CA) [285, 286].

c. Structures du complexe entre Asf1 et les histones H3 et H4

Très récemment, des données structurales sur le complexe entre le domaine N-terminal de hAsf1 ou de ScAsf1, et des fragments C-terminaux de H3 ou de H3/H4 ont été obtenues par RMN ou par cristallographie par diffraction de rayons X [134, 253, 287, 288].

Les deux études les plus complètes, qui utilisent des fragments du domaine C-terminal comprenant les trois hélices de H3 (60-134 ou 60-135) et de H4 (20-101 ou 24-100) en interaction respectivement avec ScAsf1₁₋₁₆₄ et hAsf1₁₋₁₅₄, montrent qu'il y a deux zones d'interaction. La zone d'interaction principale fait intervenir l'hélice α_3 et la moitié C-terminale de l'hélice α_2 de l'histone H3, et la seconde zone, la partie C-terminale de H4 [134, 253] (Figure III-13).

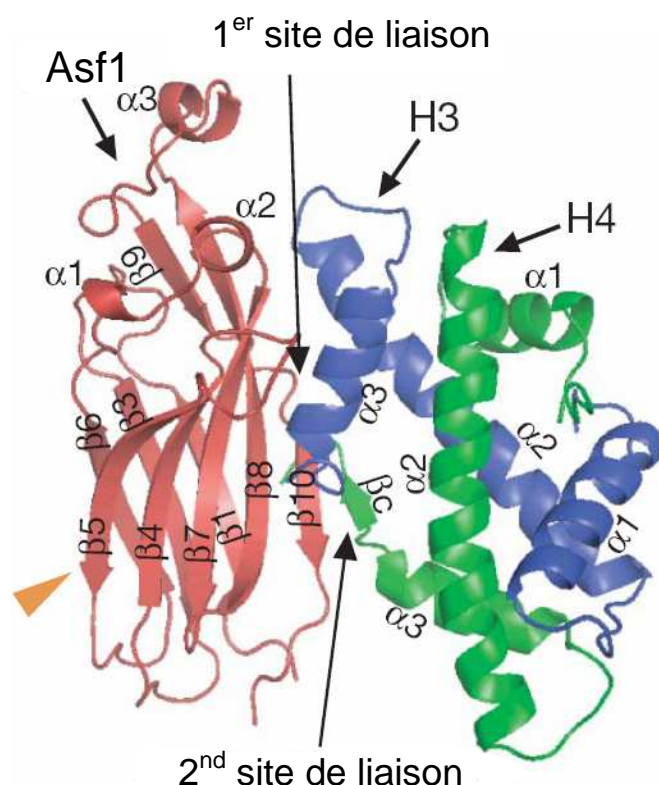


Figure III-13 Complexe ternaire à une résolution de 2,7 Å entre la protéine hAsf1₁₋₁₅₄ (rouge) et les histones H3₆₀₋₁₃₅ (bleu) et H4₂₄₋₁₀₀ (vert). Le premier site de liaison fait intervenir l'hélice α₃ et l'extrémité C-terminale de α₂. Le second site de liaison fait intervenir l'extrémité de l'histone H4 en formant un feuillet β anti-parallèle (β_c) avec Asf1 [253]. Le triangle orange indique le site de liaison opposé de HirA, un autre partenaire de hAsf1 [289].

La surface d'interaction de H4 avec Asf1 est située à la limite entre les deux brins β₁ et β₁₀, et représente environ 500 Å². L'extrémité C-terminale de H4 (95-97 ou 95-98) forme un nouveau brin β anti-parallèle avec les brins β d'Asf1 et crée un réseau de liaisons hydrogène qui connecte les trois protéines [134, 253]. L'interaction est aussi stabilisée par le résidu F100 qui est fixé dans une cavité hydrophobe entre les brins β₁ et β₁₀ par l'intermédiaire de liaison Van Der Waals [253]. Globalement, la formation du complexe Asf1–H3/H4 ne modifie pas la conformation de Asf1, par contre l'extrémité C-terminale du peptide H4 fait une rotation de 180° pour venir former ce brin anti-parallèle.

Le site principal de fixation sur Asf1, d'une surface d'environ 900 Å², fait intervenir la partie C-terminale de l'hélice α₂ et l'hélice α₃ de l'histone H3 [134, 253]. Ce site est composé d'une zone hydrophobe hautement conservée, légèrement renfoncée, et entourée de résidus chargés. Lors de la formation du complexe, les hélices α₂ et α₃ se réarrangent pour permettre

un contact encore plus proche avec les feuillets β . L'interaction principale fait intervenir les résidus de l'histone L_{126} (H3), R_{129} (H3) et I_{130} (H3) très conservés dans une interaction hydrophobe avec les résidus de la protéine V_{45} (Asf1), V_{92} (Asf1), V_{94} (Asf1), L_{96} (Asf1) et Y_{112} (Asf1) eux même très conservés (Figure III-14). Parmi ces résidus seul I_{130} est remplacé par L_{130} dans la levure [134].

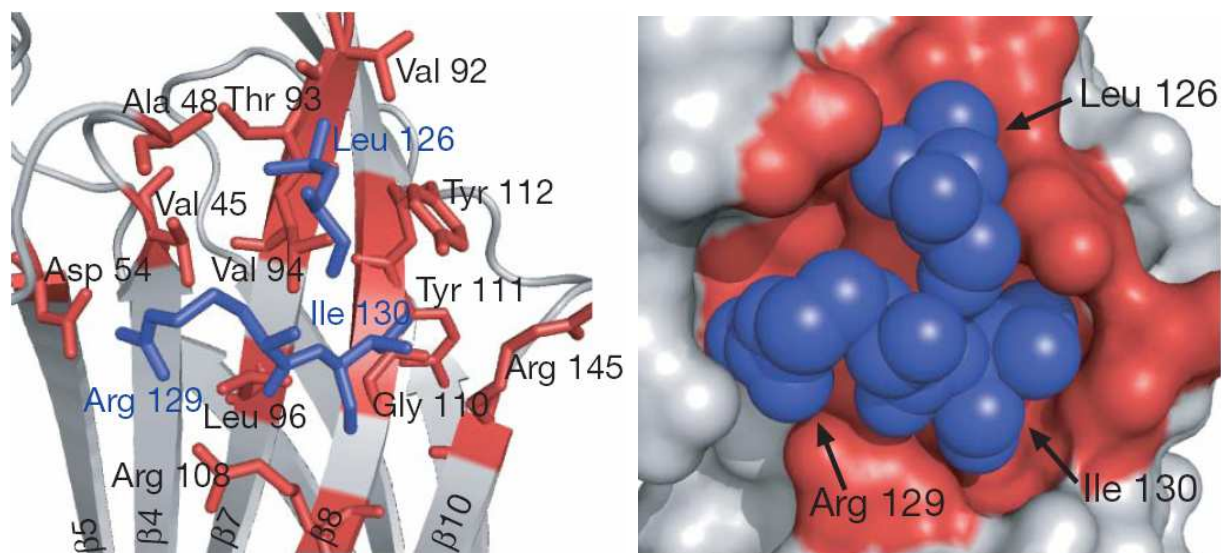


Figure III-14 Interaction entre les résidus de hAsf1 (résidus rouges) et ceux de l'histone H3 (résidus bleus) dans le premier site de liaison. A droite : Poche hydrophobe du site de liaison où vient se lier L_{126} , R_{129} et I_{130} de l'histone H3 [253].

Des expériences de mutagenèse ont notamment montré que la mutation $V94R$ déstabilise complètement *in vitro* et *in vivo* l'interaction entre hAsf1–H3/H4. La mutation de ce résidu au centre de l'interaction entraîne des défauts dans le mécanisme de « silencing » de la transcription, une sensibilité aux dommages de l'ADN et une croissance cellulaire sensible à la température [286].

De plus, des interactions ioniques et des liaisons hydrogène se forment en périphérie pour stabiliser le complexe, impliquant d'une part R_{129} (H3) et R_{134} (H3) avec D_{54} (Asf1), E_{105} (Asf1) et R_{108} (Asf1), et d'autre part K_{122} (H3) et D_{88} (Asf1) [287]. Chez l'homme, la partie hydrophobe de K_{122} (H3) interagit avec A_{48} (Asf1) et V_{92} (Asf1) [287]. La mutation de $K122E$ est létale pour la cellule alors que $R134E$ est viable [287]. Cependant, Natsume *et al.* indiquent que dans leur structure du complexe, le résidu K_{122} (H3) est accessible à de possibles enzymes de modifications post-traductionnelles [253].

L'étude de RMN, menée par notre collaboratrice F. Ochsenbein et son équipe avec le fragment H3₁₂₂₋₁₃₅, concorde avec les trois autres études cristallographiques [287]. La surface d'interaction entre le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ et la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ représente 430 Å². Dans une étude antérieure menée par la même équipe, la conformation du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ marqué ¹⁵N a été étudiée en présence ou en l'absence de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ [286]. Un spectre ¹⁵N-HSQC et l'indice de déplacements chimiques des H α des résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ indiquent que le peptide seul est non structuré en solution. Ce peptide se replie ensuite en hélice α , du résidu K₁₂₂ au I₁₃₀, au contact de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆. Cette hélice correspond à l'hélice C-terminale α_3 de l'histone H3 dans le nucléosome. De plus, les valeurs des effets Overhauser hétéronucléaires ¹⁵N-¹H du peptide lié sont consistantes avec une structure rigide comme celle du domaine N-terminal de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆, indiquant que les résidus de K₁₂₂ à G₁₃₂ sont en forte interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆ (Figure III-15).

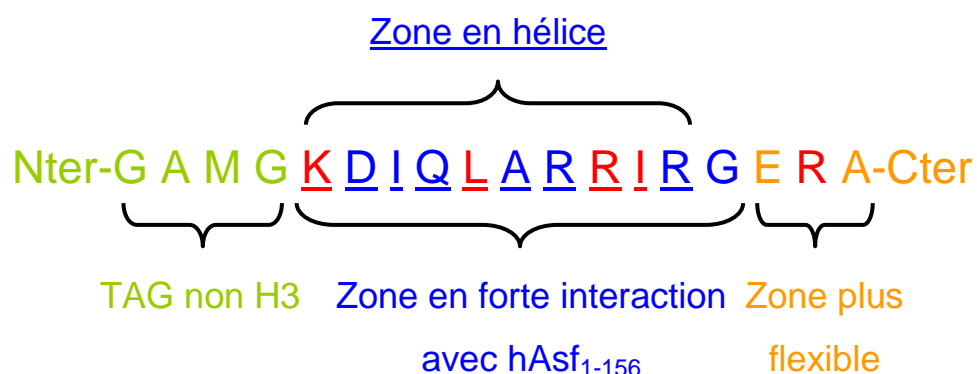


Figure III-15 Séquence du fragment H3₁₂₂₋₁₃₅ : la zone d'interaction. Les résidus en vert correspondent au reste du TAG utilisé pendant la purification du peptide. Les résidus en orange sont dans une zone flexible. Les résidus en bleu sont dans une zone en forte interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Les résidus en rouge sont les résidus observés en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆ lors de l'étude RMN [286, 287].

Afin de tester notre méthode de détection des résidus en interaction, nous avons choisi d'étudier ce peptide en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Le paragraphe suivant expose les premiers résultats obtenus avec notre méthode de caractérisation des interactions protéine–ligand, en étudiant le complexe formé entre hAsf1₁₋₁₅₆ et H3₁₂₂₋₁₃₅. Nos résultats seront principalement commentés en les comparant avec ceux obtenus par RMN chez l'humain avec les mêmes fragments protéiques par l'équipe de F. Ochsenbein et avec ceux par cristallographie de Natsume *et al.* [253, 287].

III.C Caractérisation des acides aminés de H3₁₂₂₋₁₃₅ en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆

III.C.1 Mise au point des conditions expérimentales

En nous basant sur les résultats obtenus sur le Kemptide analysé en mélange (Annexe V.B.c), des séries d'expériences ont été menées sur le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ seul (140 μ M), avec le LINAC (20 Gy par impulsions à 0,4Hz), en faisant varier le nombre d'impulsions et le nombre d'équivalents en ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹).

- **Effets du nombre d'impulsions sur l'incorporation de tritium**

La première série d'expériences a été de faire varier le nombre d'impulsions de 25 à 100 (2 à 8 eq. en HO^\bullet) pour obtenir un marquage significatif sur l'ensemble des acides aminés de H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μ M) en présence d'un équivalent en ³H-BPASS.

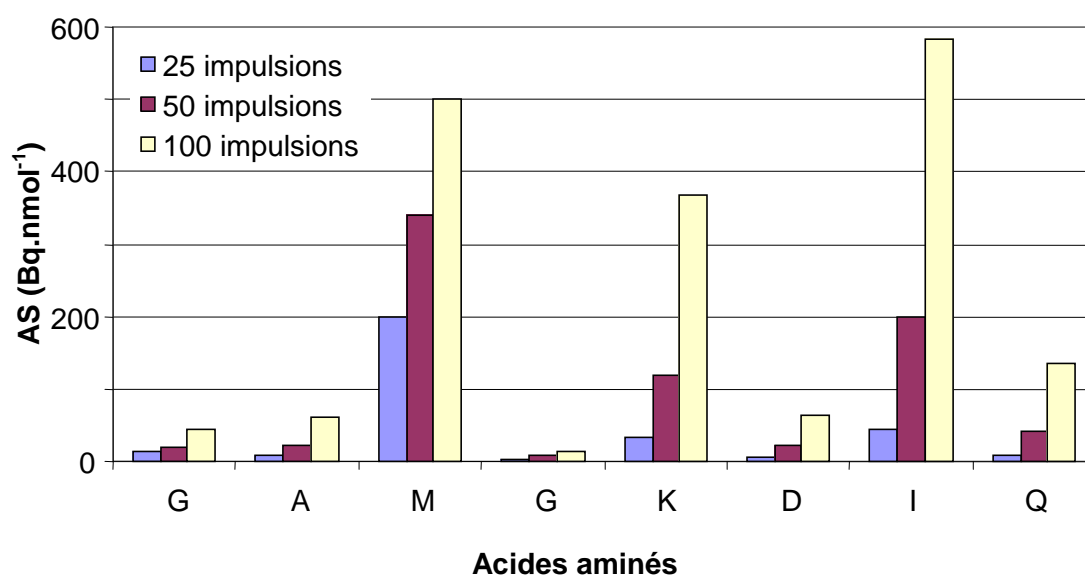


Figure III-16 Incorporation de tritium analysée sur les huit premiers acides aminés du fragment H3₁₂₂₋₁₃₅ seul.

De manière logique, l'incorporation de tritium est bien meilleure à huit équivalents en HO[•] et permet même de marquer significativement l'une des deux glycines présentes, l'acide aminé le moins marqué dans l'échelle de réactivité (Figure II-12). Il est à noter que lors de l'expérience avec 100 impulsions, plus de 50 % de ce peptide de 18 acides aminés a été dégradé.

Toutefois, en dehors de l'interaction entre les deux partenaires, la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ va provoquer globalement par sa présence une protection du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ vis-à-vis des radicaux hydroxyle. En effet, les HO[•] générés peuvent réagir entre eux et sur toutes les entités présentes dans la solution (tampon phosphate, protéine, peptide, ³H-BPASS). Pour un même nombre d'impulsions, le peptide réagira avec moins de HO[•] en présence de la protéine qu'en son absence. Cet effet a aussi été testé pour évaluer si l'incorporation de tritium sur le peptide en présence de hAsf1₁₋₁₅₆ était satisfaisante, tout en testant aussi le nombre d'équivalents nécessaire en agent de réparation ³H-BPASS.

- **Effet du nombre d'équivalents en ³H-BPASS et de la présence de hAsf1₁₋₁₅₆**

Une autre série d'expériences a été réalisée avec H3₁₂₂₋₁₃₅ en présence de hAsf1₁₋₁₅₆ avec un pourcentage théorique de protéine complexée ([RL]) de 80 %, calculé à partir d'un K_d de 40 μM estimé par RMN (F. Ochsenbein donnée personnelle). Cette expérience, menée avec le LINAC, utilise 100 impulsions (20 Gy ; 0,4 Hz) et fait varier la quantité d'agent de réparation ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) de 1 à 4 équivalents.

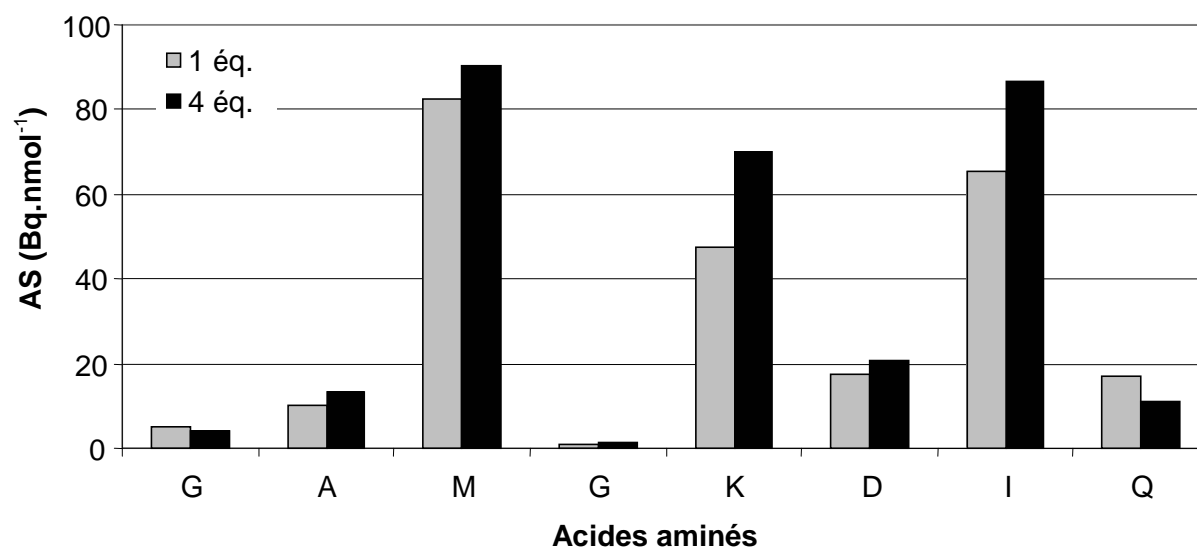


Figure III-17 Incorporation de tritium analysée sur les huit premiers acides aminés du fragment H3₁₂₂₋₁₃₅ en présence de hAsf1₁₋₁₅₆ (100 impulsions) avec 1 ou 4 éq. de ³H-BPASS.

L'augmentation du nombre d'équivalents de ³H-BPASS de 1 à 4 n'accroît pas de manière significative l'incorporation de ³H sur les acides aminés du peptide H3. Comme nous l'avons vu précédemment, la quantité d'agent de réparation ne semble pas être un facteur limitant dans les conditions utilisées (Annexe Figure V-8 ; Figure V-9). Ainsi, l'utilisation d'un seul équivalent en ³H-BPASS est suffisante pour obtenir un marquage exploitable.

La présence de la protéine hAsf1 induit quant à elle une diminution de l'activité spécifique mesurée pour les résidus de H3 de 5 à 10 fois. Cependant, à l'exception des deux glycines qui sont très peu marquées, les autres acides aminés présentent une activité spécifique significative.

Ces expériences de mises au point du marquage sur le complexe entre H3₁₂₂₋₁₃₅ et hAsf1₁₋₁₅₆ nous ont permis d'obtenir des conditions de marquage satisfaisantes pour la plupart des acides aminés séquencés (1 éq. ³H-BPASS, 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz, pour 140 µM de peptide et 280 µM de protéine, [RL] de 80 %, K_d = 40 µM).

III.C.2 Caractérisation des acides aminés de H3₁₂₂₋₁₃₅ impliqués dans l'interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆

L'étude des résidus du fragment d'histone H3₁₂₂₋₁₃₅ en interaction avec la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ a été réalisée avec un pourcentage théorique de protéine complexée [RL] de 80 %. Notre méthode d'identification des résidus en interaction a été dans un premier temps appliquée à H3₁₂₂₋₁₂₅ en présence ou en absence de son partenaire hAsf1₁₋₁₅₆, avec le même nombre d'impulsions. Après purification, H3₁₂₂₋₁₃₅ a été séquencé et l'activité spécifique calculée pour chacun des acides aminés en normalisant sur le résidu M_{3 TAG}¹⁴ (Figure III-18).

¹⁴ Les quatre résidus (GAMG) en N-terminal correspondent au reste d'une étiquette ayant servi pour la purification du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅. Nous avons utilisé la méthionine du TAG (M_{3 TAG}), bien marquée, qui n'est pas en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆, pour normaliser les activités spécifiques des résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅.

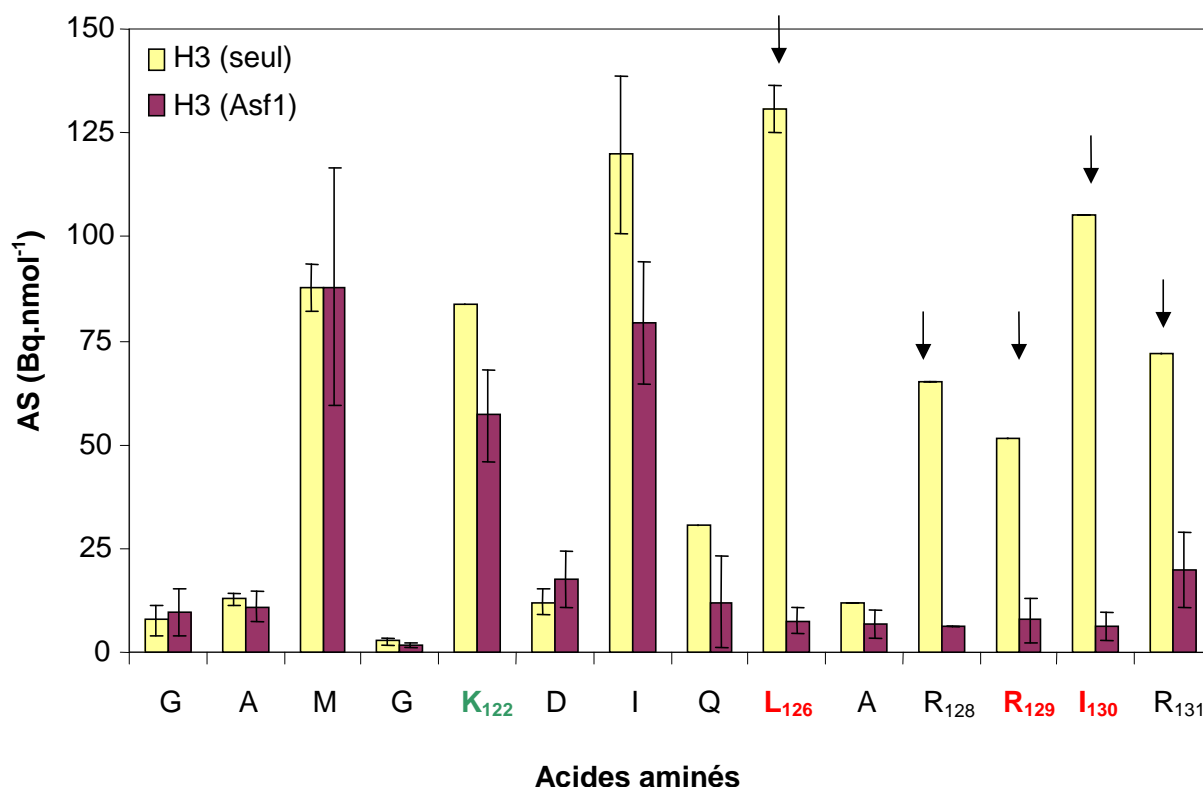


Figure III-18 Incorporation en ^3H sur le fragment GAMG-H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μM) en présence de hAsf1₁₋₁₅₆ (280 μM) (100 impulsions à 20 Gy 0,4 Hz ; 1 éq. ^3H -BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée en N₂O). Les valeurs de l'essai H3 (Asf1) obtenues sont des moyennes de 3 essais normalisées sur M_{3 TAG}. Les valeurs de l'essai H3 (seul) obtenues sont des moyennes de 2 essais normalisées sur M_{3 TAG} (une seule valeur a été obtenue pour les résidus K₁₂₂, Q₁₂₅, et de A₁₂₇ à R₁₃₁. Les derniers résidus n'ont pas été collectés). Les résidus marqués en rouge et en vert sont les acides aminés observés par RMN en interaction avec la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ [287]. Les flèches indiquent les résidus détectés par notre méthode.

Ces premiers résultats sont intéressants car ils permettent de mettre en évidence la diminution d'incorporation de tritium pour les trois résidus principaux (L₁₂₆, R₁₂₉, I₁₃₀) impliqués dans l'interaction hydrophobe avec hAsf1₁₋₁₅₆. Cependant, comme nous l'avons suggéré précédemment, à cause d'une dégradation importante, la quantité récupérée de peptide H3₁₂₂₋₁₃₅, irradié seul, n'a pas été suffisante pour obtenir toutes les valeurs.

Pour limiter la dégradation du peptide, nous pouvions soit diminuer la concentration cumulée en HO \cdot , soit ajouter une protéine de taille comparable à hAsf1₁₋₁₅₆ pour mimer et jouer un rôle similaire de protection, tout en n'interagissant pas avec H3₁₂₂₋₁₃₅. Le premier choix impliquait de déterminer le nombre d'impulsions permettant de générer une quantité de HO \cdot comparable à celle qui a réagit avec le peptide en présence de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆.

Cette voie nécessitait de réaliser des mises au point supplémentaires. Nous avons donc choisi d'utiliser la seconde approche. C'est l'apomyoglobine qui a été choisie pour mimer la présence d'hAsf1₁₋₁₅₆ en solution, parce qu'elle présente un nombre de résidus équivalents, soit 154 acides aminés contre 156 pour le domaine N-terminal de la protéine hAsf1.

En réalisant dans des conditions identiques le marquage des protéines H3₁₂₂₋₁₃₅/Apo ou de H3₁₂₂₋₁₃₅-hAsf1₁₋₁₅₆, les activités spécifiques brutes obtenues pour les résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ dans les deux cas sont similaires, à l'exception logiquement des résidus en interaction (Figure V-12 en annexe). Les résultats ont été normalisés sur M₃ TAG et présentés dans la Figure III-19.

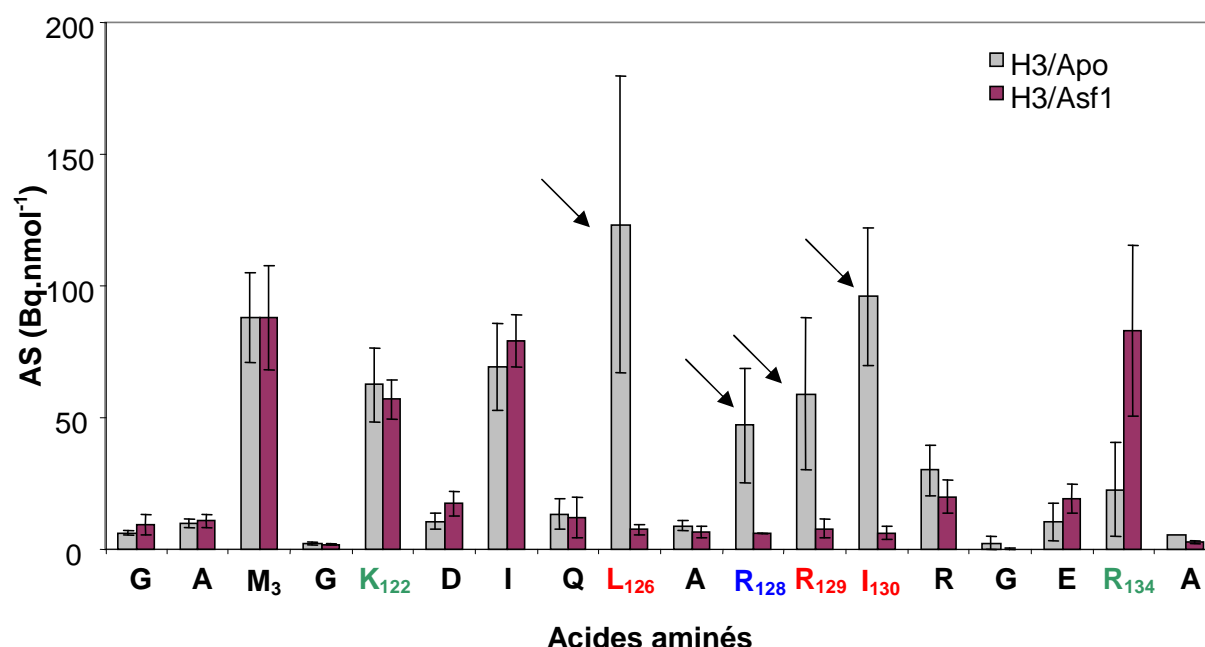


Figure III-19 Incorporation de tritium sur le fragment GAMG-H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μ M) en présence d'apomyoglobine (APO) (280 μ M) ou de hAsf1₁₋₁₅₆ (280 μ M) (100 impulsions à 20 Gy 0,4 Hz ; 1 μ eq. ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée en N₂O). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais normalisées sur M₃ TAG. Les résidus marqués en rouge et en vert sont les acides aminés observés par RMN en interaction avec la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ (Agez 2007). Le résidu en bleu n'est pas observé en interaction par RMN. Les flèches indiquent les résidus détectés par notre méthode.

De nouveau, une diminution significative d'incorporation de tritium sur H3 est observée pour les trois résidus principaux de l'interaction (L₁₂₆, R₁₂₉ et I₁₃₀) (Figure III-19). Ces acides aminés font partie du cœur hydrophobe principal qui régit l'interaction entre l'hélice α_3 de

l'histone H3 et hAsf1₁₋₁₅₆ (Figure III-20). Notre méthode permet donc de détecter les résidus impliqués dans cette interaction hydrophobe.

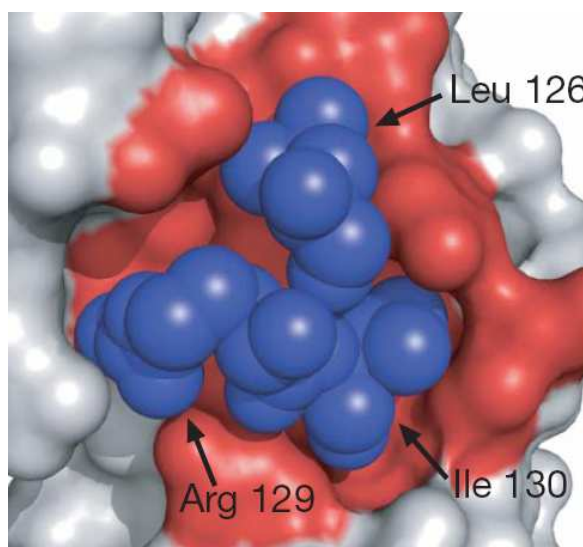


Figure III-20 Interaction entre les résidus de hAsf1 (résidus rouges) et ceux de l'histone H3 (résidus bleus) dans le premier site de liaison. A droite : Poche hydrophobe du site de liaison où vient se lier L₁₂₆, R₁₂₉ et I₁₃₀ de l'histone H3 [253].

Toutefois, notre méthode détecte aussi une diminution d'incorporation de tritium pour le résidu R₁₂₈ qui n'est pas situé dans la zone d'interaction. Ce résultat peut être facilement expliqué par un phénomène de repliement du peptide. En effet, l'analyse RMN pour le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ a montré qu'en solution, en absence de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆, le peptide est non structuré. En présence de la protéine, H3₁₂₂₋₁₃₅ se replie sous forme d'une hélice α (III.B.4) [286]. L'accessibilité au solvant des atomes du résidu diminue globalement de 2,7 fois et de plus de 10 fois en ce qui concerne les liaisons C–H, qui deviennent alors très peu accessibles (calculs avec le logiciel WHAT IF; annexe V.D.1c). La diminution d'incorporation de tritium est donc due pour ce résidu au passage du peptide d'une forme dépliée à une forme repliée en hélice α lors de l'interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Notre méthode liée à la notion d'accessibilité des acides aminés aux molécules d'eau, est donc logiquement sensible à la fois au phénomène d'interaction et au phénomène de repliement.

Deux autres résidus, K₁₂₂ et R₁₃₄ font aussi partie des résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ montrés en interaction partielle avec hAsf1₁₋₁₅₆ par RMN [287]. Ces deux résidus servent notamment à stabiliser le complexe en formant un réseau de liaisons hydrogène et d'interactions ioniques. R₁₃₄ (H3) et R₁₂₉ (H3) interagissent notamment avec D₅₄ (Asf1), E₁₀₅ (Asf1) et R₁₀₈ (Asf1), et K₁₂₂ (H3)

avec D₈₈ (Asf) [287]. Cependant, ces deux résidus ne sont pas détectés par notre méthode. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces différences entre les deux méthodes.

Natsume *et al.* précisent que dans le complexe hAsf1-H3/H4, K₁₂₂ est encore accessible à de potentielles enzymes de modifications post-traductionnelles. Ainsi, ce résidu tout en interagissant avec hAsf1₁₋₁₅₆, aurait néanmoins certaines liaisons C–H toujours accessibles (Figure III-21). L'absence partielle de protection de K₁₂₂ pourrait expliquer pourquoi cette interaction secondaire n'a pas été détectée par notre méthode. De plus, ce résidu se situe à l'extrémité N-terminale de l'hélice α . Lors de la dynamique de l'interaction, les extrémités de l'hélice seraient les premières à se déplier. Ainsi, le temps de résidence du résidu K₁₂₂ dans le site d'interaction ne serait pas suffisant pour permettre une protection efficace vis-à-vis des HO[•] et de ³H-BPASS.

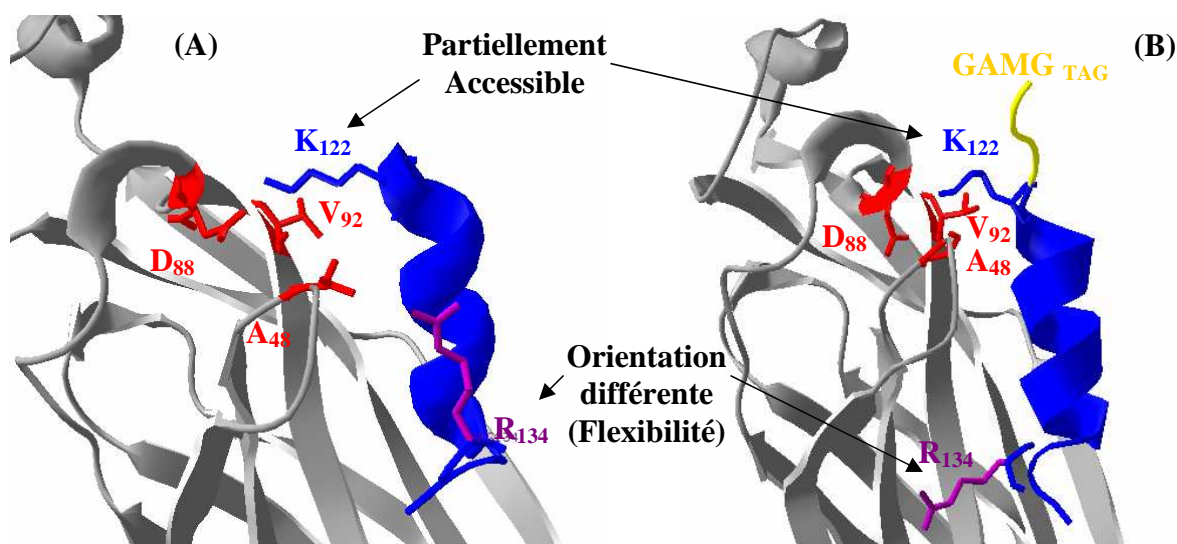


Figure III-21 Structures de hAsf1₁₋₁₅₆-H3₁₂₂₋₁₃₅ obtenues par cristallographie par diffraction de rayons X (A) ou par RMN (B) [253, 287]. Les résidus de hAsf1₁₋₁₅₆ sont représentés en gris et en rouge (en interaction), les résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ en bleu et le TAG GAMG en jaune. Les chaînes latérales des résidus K₁₂₂ (H3) en interaction avec D₈₈ (Asf1), A₄₈ (Asf1) et V₉₂ (Asf1) sont représentées, ainsi que le résidu R₁₃₄ (H3) en violet.

De même, le résidu R₁₃₄ situé sur l'extrémité C-terminale du peptide, par nature très flexible et non structurée, serait de ce fait moins en interaction que les autres résidus. Ainsi, la mutation de ce résidu n'entraîne aucun changement phénotypique [287]. De plus, dans la structure cristallographique de Natsume *et al.*, la chaîne latérale du résidu R₁₃₄ n'est pas du tout orientée de la même façon que lors de l'étude de RMN (Figure III-21) [253]. Cette différence de résultats peut être imputée au caractère flexible de l'extrémité C-terminale qui

complicque ainsi l'interprétation des signaux de ce résidu en RMN et en cristallographie. Le caractère secondaire de ce résidu dans l'interaction n'induit pas un temps de résidence suffisant pour que notre méthode puisse détecter ce résidu.

Notre méthode, basée sur la détection et la quantification des radicaux sur les protéines, a permis d'identifier les résidus principaux de H3₁₂₂₋₁₃₅ impliqués dans l'interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Il s'agit de résidus hydrophobes L₁₂₆ et I₁₃₀ et de l'acide aminé chargé positivement R₁₂₉. Il faut également noter que notre méthode rend également compte du phénomène de repliement puisque le résidu R₁₂₈, hors de la zone d'interaction, a aussi présenté une diminution très significative d'incorporation de tritium lors de la formation de l'hélice α au contact de hAsf1₁₋₁₅₆. Toutefois, deux résidus n'ont pas été mis en évidence avec notre méthode. Il s'agit des résidus K₁₂₂ et R₁₃₄ tous deux situés respectivement, sur les extrémités N-terminale de l'hélice ou C-terminale du peptide. Toutefois, les structures indiquent que le résidu K₁₂₂ reste partiellement accessible en présence de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ et que le résidu R₁₃₄ n'est pas caractérisé de manière formelle comme étant en interaction. Notre méthode a donc permis de détecter tous les résidus principaux en interaction forte, mais cependant ne permettrait pas de détecter les résidus en faible ou partielle interaction.

Suite à ces résultats satisfaisants, nous avons ensuite appliqué notre méthode pour la caractérisation des résidus de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ en interaction avec le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅, afin de montrer notamment que notre méthode est applicable à une protéine de taille moyenne (17 kDa). Les premiers résultats sont discutés dans le paragraphe suivant.

III.D Premiers essais sur la protéine hAsf1

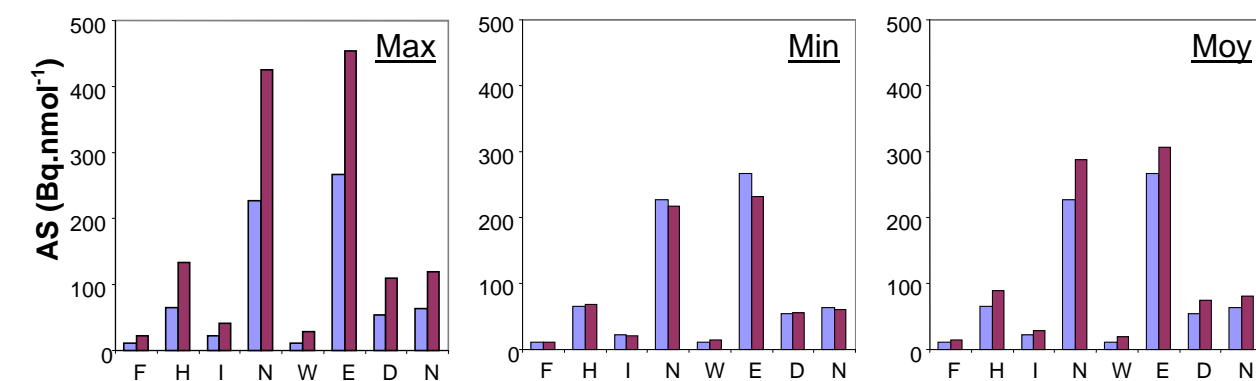
Les études ont été menées avec 200 μ M de protéine hAsf1₁₋₁₅₆ avec ou sans peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ (400 μ M), soit un pourcentage théorique de complexes formés de 85 %. Les échantillons ont été soumis à un faisceau pulsé d'électrons accélérés sous forme de 50 ou de 200 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz en présence d'un équivalent de ³H-BPASS (AS = 536 ou 629 GBq.mmol⁻¹ respectivement). La protéine a été ensuite purifiée et digérée par la trypsine et les peptides résultants ont été purifiés. Suite à des problèmes de purification, certains peptides n'ont pas été récupérés dont notamment le peptide comprenant les principaux acides

aminés de hAsf1₁₋₁₅₆ (V₉₂, V₉₄ et L₉₆) en interaction avec H3₁₂₂₋₁₃₅. Par manque de temps, seuls les peptides facilement purifiables ont été séquencés.

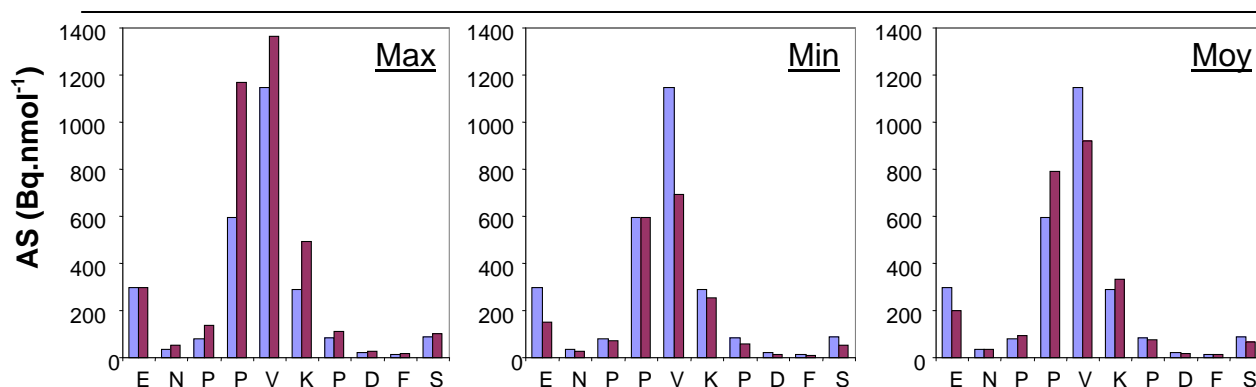
Une comparaison de l'incorporation de tritium en fonction du nombre d'impulsions (50 ou 200) est présentée en annexe et indique une incorporation 2 à 30 fois supérieure à 200 impulsion (Figure V-17 et Figure V-18 en annexe). Nous avons choisi de présenter les résultats sur des peptides issus de hAsf1₁₋₁₅₆ obtenus à 200 impulsions. Ces résultats ne correspondent qu'à une seule expérience et donc qu'à une seule donnée par acide aminé.

Selon les résultats de RMN et de cristallographie, les résidus des trois peptides analysés (¹²⁴-ENPPVKPDFSK-¹³⁴, ¹³⁸-NILASNPR-¹⁴⁵ et ¹⁴⁹-FHINWEDN-¹⁵⁶) ne sont pas en interaction avec le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅, à l'exception d'une interaction secondaire du résidu R₁₄₅ [253, 287].

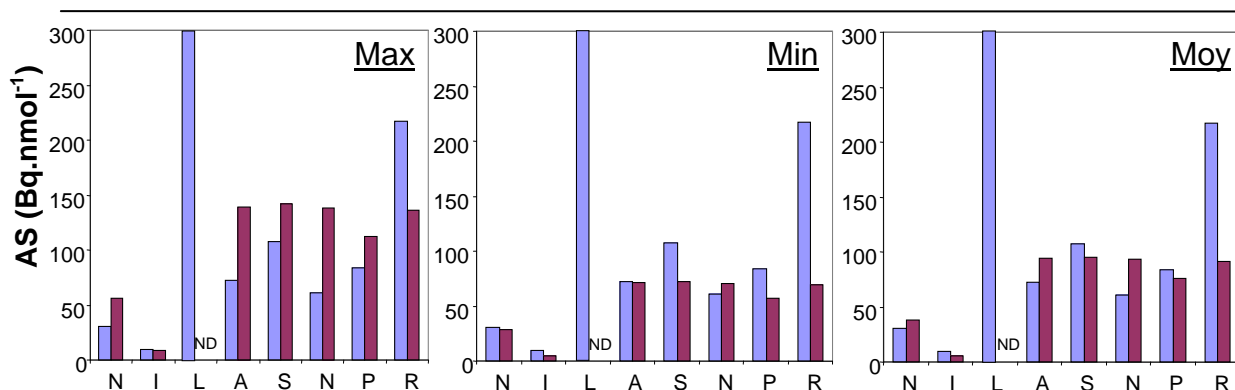
Afin de comparer nos résultats, les activités spécifiques représentées dans les histogrammes ci-dessous sont normalisées selon trois facteurs correspondant au rapport entre l'activité spécifique d'un résidu donné respectivement en absence et en présence de H3₁₂₂₋₁₃₅ (paragraphe IV.J.2). Les valeurs maximale (2,9), minimale (1,5) ou moyenne (2) sont appliquées (Figure III-22).



Acides aminés de $^{149}\text{-FHINWEDN-}^{156}$



Acides aminés de $^{124}\text{-ENPPVKPDFSK-}^{134}$



Acides aminés de $^{138}\text{-NILASNPR-}^{145}$

L'activité spécifique du résidu L est d'environ 1300 Bq.nmol⁻¹. L'histogramme est coupé à 300 Bq.nmol⁻¹. (ND = non déterminé)

- Asf1 (seul)
- Asf1 (H3)

Max = normalisé sur la plus haute valeur (2,9)
 Min = normalisé sur la plus basse valeur (1,5)
 Moy = normalisé sur la valeur moyenne (2)

Figure III-22 Incorporation de tritium sur les peptides $^{124}\text{-ENPPVKPDFSK-}^{134}$, $^{138}\text{-NILASNPR-}^{145}$ et $^{149}\text{-FHINWEDN-}^{156}$, issus de la digestion par la trypsine de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ (200 μM) soumis à 200 impulsions du faisceau d'électrons accélérés en présence ou en absence de H3₁₂₂₋₁₃₅ (400 μM) pour un taux de complexes liés théorique de 85 %.

La normalisation avec le facteur correctif « maximum » n'est pas adaptée puisque quasi systématiquement toutes les activités spécifiques des résidus de hAsf1₁₋₁₅₆ sont supérieures en présence de H3₁₂₂₋₁₃₅.

Les histogrammes, présentant les deux autres normalisations avec les facteurs « minimum » et « moyen », ne montrent aucune différence significative d'incorporation de tritium en présence ou en absence de H3₁₂₂₋₁₃₅. Seul les activités spécifiques des résidus E₁₂₄ et V₁₂₈ de ¹²⁴-ENPPVKPDFSK-¹³⁴, normalisées avec le facteur « minimum », montrent une différence de 50 % et 40 % respectivement. Nous expliquons ceci simplement par l'incertitude expérimentale attribuée au fait que nous ayons seulement une seule valeur pour l'expérience à 200 impulsions. Cependant, les activités spécifiques du même peptide issu de l'expérience à 50 impulsions n'indiquent aucune différence de valeurs avec ou sans H3₁₂₂₋₁₃₅ (Figure V-19 en annexe). Ainsi nos résultats sur ces peptides, connus pour ne pas être en interaction, sont parfaitement en accord avec les données structurales.

D'après les calculs menés avec le logiciel WHAT IF à partir des données structurales, l'accessibilité du résidu R₁₄₅ diminue de moitié (24 à 12 Å²) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** en annexe). Nous observons avec notre méthode que cet acide aminé impliqué de manière secondaire dans l'interaction, possède une activité spécifique inférieure de plus de 60 % lorsqu'il est lié.

Tous ces résultats encourageant sont à confirmer puisque que les expériences à 50 et 200 impulsions ont été réalisées une seule fois.

Les différences de marquage en fonction de l'accessibilité, résidu par résidu, vis-à-vis des HO[•] et de ³H-BPASS ne seront pas commentées (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.** en annexe). En effet, l'incorporation de tritium est reliée à la fois à la réactivité du résidu dans une séquence peptidique et aux effets de voisins. Ces effets ne sont pas actuellement évalués. Toutefois, il est à noter que lorsqu'un acide aminé très réactif selon l'échelle de réactivité (I₁₃₉ et I₁₅₁), est très peu ou pas du tout accessible (0 et 0,3 Å²), l'incorporation de tritium est très faible (ce qui est en accord avec ce qui est attendu). De plus, tous les types d'acides aminés accessibles (L, V, P, K, R, H, N, E, D, A, S) présentent une incorporation significative et utilisable (AS > 50 Bq.nmol⁻¹) pour détecter une interaction,

même pour des acides aminés identifiés comme les moins réactifs lors de la réalisation de l'échelle de réactivité (A, N, S) (Figure II-12).

Toutefois, par exemple, N₁₂₅, N₁₅₂ et N₁₅₆, tous accessibles (12,7, 4,1 et 13,6 Å²) possèdent respectivement une activité spécifique d'environ 30, 200 et 50 Bq.nmol⁻¹. Ainsi, selon leur position dans la séquence protéique, l'incorporation de tritium va être soit utilisable sans ambiguïté (200 Bq.nmol⁻¹) soit être un peu faible (30 Bq.nmol⁻¹). Ainsi, une grande partie de l'incorporation de tritium sur les acides aminés issus de la protéine semble utilisable pour caractériser les interactions protéine-protéine. Mais pour les acides aminés peu réactifs, une baisse d'incorporation causée par les effets de voisins pourrait conduire à des informations non exploitables.

Cette première série d'expériences permet de montrer, qu'en présence ou en absence de H3₁₂₂₋₁₂₅, les acides aminés de hAsf1₁₋₁₅₆, qui ne sont pas impliqués selon les données structurales dans la formation du complexe avec H3₁₂₂₋₁₃₅, possèdent tous une activité spécifique équivalente après normalisation. De plus, un premier exemple encourageant montre que le résidu R₁₄₅ en interaction secondaire, possède une activité spécifique qui diminue au moins de moitié lors de la présence du fragment d'histone. Ces résultats à confirmer indiqueraient que notre méthode est efficace pour identifier les interactions protéine-ligand.

III.E Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons développé une méthode efficace de footprinting basée sur la détection et la quantification de radicaux sur les protéines, qui a permis d'identifier les acides aminés d'un peptide impliqué dans une interaction avec une protéine. En effet, les trois principaux acides aminés (L₁₂₆, R₁₂₉, I₁₃₀) de l'hélice α_3 de l'histone H3, impliqués dans une interaction hydrophobe avec hAsf1₁₋₁₅₆, ont été caractérisés grâce à une diminution de l'incorporation en radioactivité de ces résidus lors de la formation du complexe. Notre approche permet également d'identifier les résidus moins accessibles suite à la formation d'une structure secondaire. En effet, l'activité spécifique du résidu R₁₂₈, situé en dehors de la zone d'interaction, a diminuée lors du repliement de H3₁₂₂₋₁₃₅ en hélice α au contact de la

protéine hAsf1₁₋₁₅₆. Toutefois, les résidus K₁₂₂ et R₁₃₄ restant partiellement accessibles au solvant lors de la formation du complexe n'ont pas été détectés par notre méthode.

Les premiers essais sur la caractérisation des résidus de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ ont été très encourageants et positifs. En effet, l'activité spécifique de R₁₄₅ un résidu secondaire de l'interaction entre hAsf1₁₋₁₅₆ et H3₁₂₂₋₁₃₅, a diminué de moitié lors de l'interaction. L'étude a surtout permis de montrer que des résidus qui ne sont pas en interaction ne présentent pas de différence significative d'incorporation de tritium. Toutefois, tous ces résultats très positifs sur les résidus de hAsf1₁₋₁₅₆ sont à confirmer.

Parmi les trois peptides de hAsf1₁₋₁₅₆ et du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅, un total de 44 acides aminés a été analysé pour la méthode RMN et notre méthode d'échange ¹H/³H, et de 40 pour l'étude cristallographique. Le nombre d'acides aminés détectés en interaction ou non dans le complexe est représenté dans le tableau III-1 pour chacune des méthodes.

Nombre d'acides aminés détectés		Données cristallographiques		Données RMN		Données Echange ¹ H/ ³ H		Commentaires
Hors interaction	Asf1 + H3	35		34		35		
	H3	NC		4		4		Etiquette GAMG
Interaction principale	H3	3		3		3		L ₁₂₆ , R ₁₂₉ , I ₁₃₀
Interaction secondaire	H3	1	K ₁₂₂	2	K ₁₂₂ R ₁₃₄	0		
	Asf1	1	R ₁₄₅	1	R ₁₄₅	(1) [*]	R ₁₄₅	[*] à confirmer
Repliement de H3		NC		NC		1	R ₁₂₈	Hélice α ₃

Tableau III-1 Récapitulatif du nombre de résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ et de hAsf1₁₋₁₅₆ identifiés comme étant en interaction ou non. NC = non comparable.

Ce tableau indique que notre méthode permet tout comme les deux études structurales l'identification des trois résidus principaux de H3 en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Tous les résidus qui ne sont pas en interaction (34 ou 35 + 4) sont identifiés comme tels avec notre méthode, à l'exception du résidu R₁₂₈ impliqué dans une structure secondaire.

Lors des prochaines expériences, deux points essentiels seront à démontrer. Tout d'abord, les résidus de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ qui sont en interaction avec H3₁₂₂₋₁₃₅ devront être caractérisés. Puis, l'intégrité de la structure de la protéine devra être contrôlée en réalisant du dichroïsme circulaire. Une première expérience de dichroïsme circulaire sur l'apomyoglobine a montré que la protéine restait à l'état natif après irradiation (Figure V-21 en annexe). Toutefois, en toute rigueur, un spectre de dichroïsme circulaire devra aussi être fait sur la protéine hAsf1₁₋₁₅₆.

Conclusion générale

Au cours de ce travail, nous avons développé une nouvelle méthode pour la caractérisation des interactions protéine–ligand. Cette stratégie s'appuie sur la différence d'accessibilité des acides aminés à l'eau pour le partenaire seul en comparaison avec le partenaire dans l'interaction.

Le principe de cette méthode est basé sur deux étapes clés :

- la génération de radicaux carbo-centrés sur les chaînes latérales des acides aminés de la protéine.
- la réparation de ces radicaux par un atome de tritium.

Dans un premier chapitre, la mise au point de cette méthode est décrite d'abord sur les acides aminés isolés, puis sur de petits peptides. Ce travail nous a permis dans un premier temps de déterminer la réactivité de chaque acide aminé isolé vis-à-vis des radicaux hydroxyle et de l'agent de réparation tritié (^3H -BPASS) en milieu anaérobie. L'ordre de réactivité obtenu est le suivant :

Lys>Leu>Arg>Ile>Trp>Phe>Val>Cys>Met>His>Tyr>Glu>Thr>Asp>Gln>Pro>Ala>Asn>Ser>Gly

Cette échelle est tout à fait en accord avec les résultats obtenus par la méthode similaire utilisant le DTT dans l'eau lourde de l'équipe d'Anderson.

Nous avons ensuite étendu cette étude à de petits peptides non structurés. Nous avons mis en évidence qu'un même acide aminé ne présentait pas la même réactivité en fonction de sa position dans la séquence peptidique. Ces résultats renforcent des observations récentes montrant des effets liés aux résidus ou groupements voisins [240, 253].

Nous avons choisi d'appliquer ensuite cette stratégie à la caractérisation des interactions protéine–protéine et de l'appliquer au complexe formé entre la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ et le fragment 122-135 de l'histone H3. Cette première étude a permis de caractériser sans

ambiguïté les trois résidus principaux (L_{126} , R_{129} et I_{130}) impliqués dans l'interaction hydrophobe et ionique.

Cependant, les résidus qui restent partiellement accessibles lors de l'interaction ou qui sont situés dans des zones flexibles de l'interaction (K_{122} et R_{134}) ne sont pas clairement identifiés. Par contre, notre méthode permet également de mettre en évidence la différence d'accessibilité au solvant d'un résidu liée à des effets de repliement du peptide en hélice α . Notre méthode de caractérisation des interactions protéiques est donc à la fois sensible aux phénomènes d'interaction et de repliement.

En ce qui concerne la protéine Asf1 les premiers résultats sont encourageants. En effet, sur trois peptides non impliqués dans l'interaction, nous n'avons pas observé de différence significative d'incorporation de tritium.

Plusieurs perspectives se dégagent de ces travaux.

Tout d'abord, il serait intéressant de développer de nouveaux donneurs de tritium afin d'augmenter le panel de radicaux facilement détectables par notre méthode. La chimie a le pouvoir de permettre de synthétiser toute une gamme de composés de fonctions variées. Ainsi, des agents réparateur de différentes tailles, chargés négativement ou positivement pourraient être obtenus, et faciliter le marquage de tel ou tel acide aminé, notamment des acides aminés aromatiques.

Ensuite, afin d'être complet pour cette étude, il est nécessaire de caractériser les acides aminés de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ en interaction avec le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅. Il serait également intéressant de réaliser la même étude sur le complexe entier de hAsf1-H3/H4. De plus, la protéine Asf1 possédant de nombreuses fonctions et de nombreuses protéines partenaires, l'étude d'autres complexes l'impliquant est à envisager. Tout d'abord sur des complexes dont la structure est connue (HirA par exemple) puis sur d'autres complexes peu ou pas caractérisés. Finalement la transposition de notre méthode à la caractérisation des interactions de type protéine-lipide ou protéine-ADN est également envisageable.

Enfin, notre méthode étant directement basée sur la caractérisation de l'accessibilité au solvant des acides aminés d'une protéine, il devrait être possible de l'utiliser pour réaliser des cartographies de surface de protéines une fois les effets de voisins mieux caractérisés.

En conclusion, notre approche devrait s'inscrire comme une méthode alternative aux autres techniques de « footprinting ». En effet, notre méthode permet en théorie d'étudier de larges complexes à une résolution de l'acide aminé. Notre technique permet d'obtenir sans modification de structure, une couverture de surface des protéines au moins égale à celle du « footprinting par oxydation » par les radicaux hydroxyle.

Les informations de surface apportées par notre méthode peuvent refléter à la fois des phénomènes d'interaction, des phénomènes de repliement mais aussi des changements de conformation. L'utilisation en combinaison de méthodes de modélisation moléculaire devrait permettre de différencier ces phénomènes et d'obtenir des structures de complexes de basses résolutions. Notre méthode pourra être utilisée de manière complémentaire à des techniques plus résolutive comme la RMN, en apportant des informations au niveau de l'acide aminé en interaction. Des études de mutagenèse pourront être entreprises pour valider l'importance des résidus acides aminés détectés dans l'interaction. Notre méthode développée sur la caractérisation de l'interface entre hAsf1₁₋₁₅₆ et H3₁₂₂₋₁₃₅ est donc une méthode alternative aux méthodes de basse résolution et complémentaire des méthodes telles la RMN et la cristallographie pour la détection des acides aminés en interaction.

IV Matériels et méthodes

IV.A Préparation des composés

IV.A.1 Matériels commerciaux

L-acides aminés, dichlorophénylphosphine (PhPCl_2), kemptide (LRRASLG), α -mating factor fragment 1-6 (WHWLQL), β -Casomorphine (YPFVEPI), Dowex 50 W*8, chlorure de dansyle (DsCl) proviennent de Sigma-Aldrich. Les peptides RNAIII-inhibiting peptide [RIP] (YSPWTNF), Laminine nonapeptide (CDPGYIGSR), Adrénocorticotropique Hormone [ACTH] (MEHFRWG), Angiotensine (DRVYIHP), Oxytocine (CYIQNCPLG), Neurokinine A (HKTDSFVGLM) proviennent de NeoNPS (Strasbourg, France), et les peptides Murine (YPHFMPNTL), peptide 10 (LQAAPALDKL), Pneumadine (AGEPKLDAGV), Met₂-Deltorphine (YMFHLMD), Leu-Valorphine-Arg (LVVYPWTQR) de Bachem. Le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ (GAMGKDIQLARRIRGERA) provient d'Epytop (Nîmes, France). Oxyde de platine IV (PtO_2) provient de Merck, gaz tritium (98.9% tritium, 0.7% deutérium, 0.4% hydrogène) de Tritec (Switzerland), et l'eau tritiée (37 GBq.mL^{-1}) d'Amersham.

IV.A.2 Expression et Purification de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆

a. Expression de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆

Le vecteur d'expression pETM30 est choisi. C'est un plasmide qui permet, chez la bactérie *E. coli* DE3, l'expression d'une protéine de fusion GST étiquetée 6 histidines à son extrémité N-terminale. Le vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine de fusion hAsf1₁₋₁₅₆ a été fourni par F. Ochsenbein du CEA Saclay.

La surexpression de la protéine recombinante dans des bactéries *E. coli* B121 Gold DE3 à 20°C est induite par l'ajout d'IPTG dans le milieu LB. Après une nuit d'induction, les bactéries sont récoltées par centrifugation (5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C), puis resuspendues dans un tampon favorisant la lyse des bactéries (tampon Tris 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Glycérol 5 % (v/v), Triton 100X 1 % (v/v), PMSF 1 mM, DTT 1 mM, aprotinine 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les parois de bactéries B121 gold DE3 sont fragilisées par congélation-décongélation puis par l'incubation avec du lysozyme (Sigma) à 0,5 mg.mL^{-1} pendant une heure à 4°C. L'ADN est détruit par émission d'ultrasons dans le milieu. Les bactéries lysées sont centrifugées à 10000 rpm pendant 30 minutes à 4°C afin de séparer les

débris cellulaires et les corps d'inclusion de tous les composants solubles. La présence de la protéine recombinante dans la fraction soluble est vérifiée par SDS-PAGE.

b. Purification de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆

La purification comporte trois étapes, deux chromatographies d'affinité, une colonne de GSH-agarose suivie d'une Ni-NTA, et enfin une chromatographie échangeuse d'ions. Ces trois étapes sont détaillées dans ce qui suit.

i. Purification GSH-agarose

La fraction soluble, préalablement filtrée sur filtre 0,22 µm, est chargée sur une colonne de billes d'agarose couplées au glutathion réduit. Ces billes sont préalablement réhydratées et équilibrées avec le tampon de lyse des bactéries. 1 mL de billes peuvent fixer environ 10 mg de protéine de fusion ; pour un litre de culture il faut compter environ 10 mL de billes. Ces billes sont lavées avec 5 volumes de tampon Tris 50 mM pH 8, NaCl 1M, puis équilibrées avec 5 volumes de tampon phosphate 50 mM pH 8. Enfin, la protéine est éluée avec du tampon phosphate 50 mM pH 8 contenant 10 mM glutathion réduit (Figure IV-1).

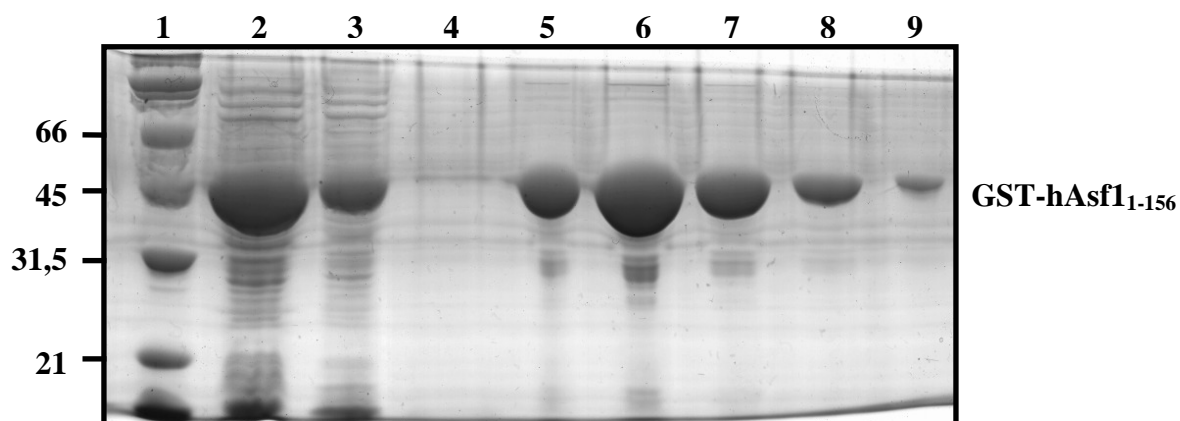


Figure IV-1 SDS-PAGE de la purification par chromatographie d'affinité GSH-agarose de GST-hAsf1₁₋₁₅₆. puits 1, marqueurs de poids moléculaires ; 2, surnageant avant passage sur colonne ; 3, surnageant après passage sur colonne; 4, lavage NaCl 1M ; 5, billes avant élution ; 6, 7 et 8 éluions de 10 mL de GSH ; 9, billes après élution .

La quantité de protéine de fusion élue est déterminée par Bradford et par gel SDS-PAGE. Les protéines sont révélées sur le gel par coloration dans une solution de bleu de Coomassie : 40 % éthanol, 10 % acide acétique, 400 mg.L⁻¹ de bleu de Coomassie (Sigma). Le gel est représenté sur la Figure IV-1.

ii. Purification de la protéase Tev et coupure de la protéine recombinante

Un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéase du virus Tev étiquetée six histidines est utilisée pour transformer des bactéries *E. coli* BL21 Gold DE3 pLysS (fourni par F. Ochsenbein du CEA Saclay). Après induction de l'expression de la protéine recombinante, les cellules sont cassées et centrifugées afin de récupérer le surnageant. La protéine recombinante est purifiée sur colonne Ni-NTA. Trois lavages à des concentrations en imidazole de 9, 30 et 80 mM sont effectués. La protéine est éluée à 300 mM d'imidazole. L'imidazole est très rapidement éliminé par ultracentrifugation et la protéine est resuspendue dans un tampon contenant 50 % de glycérol. Elle est alors congelée à -80°C. La quantité de protéase purifiée est estimée par Bradford.

La protéine de fusion GST-hAsf1₁₋₁₅₆ est clivée par la protéase du virus TEV étiquetée (His)₆ dans un rapport de 1% (w/w) de protéase/protéine de fusion pendant 16 heures à température ambiante. La qualité du clivage est contrôlée par SDS-PAGE.

iii. Purification Ni-NTA

L'éluât ainsi traité est complété à moitié avec du tampon Tris 50 mM pH8, Imidazole 10 mM, PMSF 5mM et incubé pendant une heure à 4°C sur roue avec des billes Ni-NTA agarose (Qiagen) elles-mêmes équilibrées avec ce tampon. Les billes sont coulées dans une colonne de 20 mL et la première fraction est directement collectée ainsi que 2 autres après ajout du même tampon. Les fractions sont déposées sur gel SDS-PAGE afin de déterminer la quantité de protéine dans chacune d'entre-elles (Figure IV-2).

iv. Chromatographie échangeuses d'anions

La purification est réalisée sur le système HPLC Akta d'Amersham Pharmacia Biotech comportant différents modules synchronisés entre eux et automatisés, avec en série un collecteur de fractions. Les procédures sont programmées via le logiciel UNICORN (version 4.11). Après filtration sur filtre 0,22 µm, la protéine est injectée par une boucle de 150 µL sur une colonne échangeuse d'anions Resource Q (Amersham). Après une étape d'élimination (avec 0 % de B) des protéines interagissant avec la colonne de manière non spécifique, en faisant passer du tampon Tris 50 mM pH 8 contenant 50 mM NaCl, la protéine est séparée des autres en appliquant un gradient de sel non linéaire de 0 à 20 % de B en 10 min, 20 à 40 % B en 40 min, avec un débit de 2 mL.min⁻¹ (A : Tp Tris 50 mM pH 8 ; B : Tp Tris 50 mM pH 8 / NaCl 1N). La protéine hAsf1₁₋₁₅₆ sort à 22 % de B.

La pureté de la protéine est contrôlée sur gel SDS-PAGE (Figure IV-2).

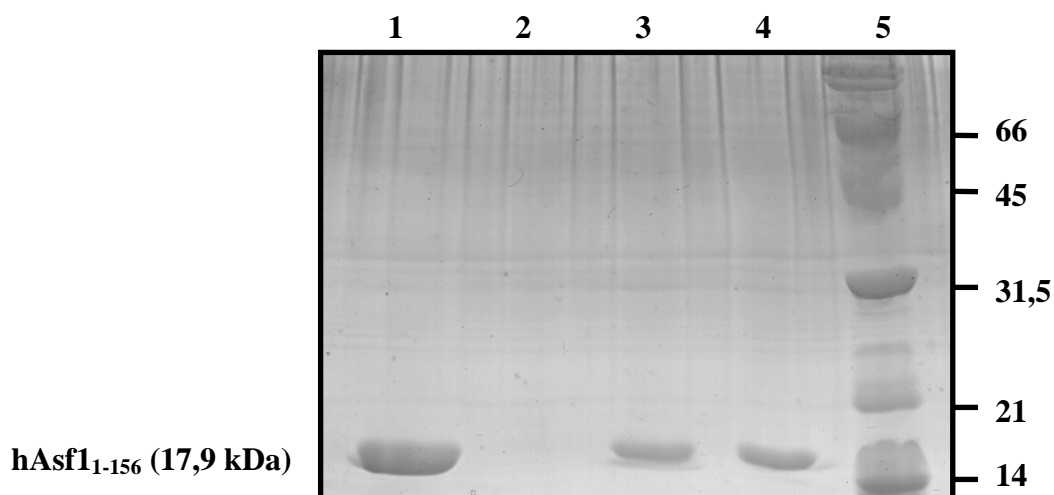


Figure IV-2 SDS-PAGE contrôle de la purification sur colonne NiNTA et de la chromatographie HPLC échangeuse d'anion de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆. puits 1, hAsf1₁₋₁₅₆ purifiée sur colonne échangeuse d'anion ; 3 et 4, hAsf1₁₋₁₅₆ purifiée de la colonne NiNTA ; 5, marqueurs de poids moléculaires.

v. Concentration de l'échantillon

La solution de protéine est concentrée en réalisant un changement de tampon avec du tampon phosphate 10 mM pH 7,9 par ultrafiltration sur cellule AMICON (Millipore) avec une membrane YM10 (« cut-off » de 10 kDa) de 45 mm de Ø puis 25 mm. La solution concentrée entre 500 μ M et 1 mM est estimée par mesure de l'absorbance à 280 nm ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 20340 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La concentration exacte est obtenue par une analyse de la composition en acide aminé et de la concentration protéique en réalisant une hydrolyse acide HCl 6N.

IV.A.3 Préparation de l'apomyoglobine

La metmyoglobine de coeur de cheval lyophilisée (Sigma M-1882) est reprise dans l'eau pure et dialysée contre de l'eau. L'apomyoglobine est préparée selon la méthode précédemment publiée et ensuite lyophilisée [290]. La solution d'apomyoglobine est préparée en solubilisant la protéine dans l'eau ultrapure et en la dialysant contre de l'eau ultrapure puis contre du tampon phosphate 10 mM pH 7,9. La concentration est déterminée par absorption ultraviolet ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 13500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [291] et ajustée à une concentration finale entre 500 μ M et 1 mM. La concentration exacte est obtenue par une analyse de la composition en acide aminé et de la concentration protéique en réalisant une hydrolyse acide HCl 6N.

IV.A.4 La préparation du donneur de ^3H (^3H -BPASS)

La synthèse de l'acide phénylphosphinique tritié (^3H -BPASS) est réalisée dans une boîte à gants étanche où est présent un banc de tritiation. Ce banc, relié à une pompe à vide, est composé d'un réseau de tubulures compartimentalisées par des vannes étanches, de capteurs de pression, de cartouches de charbon et de deux fours thermorégulés contenant le gaz tritium piégé sur un lit de La/Ni/Mn (Figure IV-3).

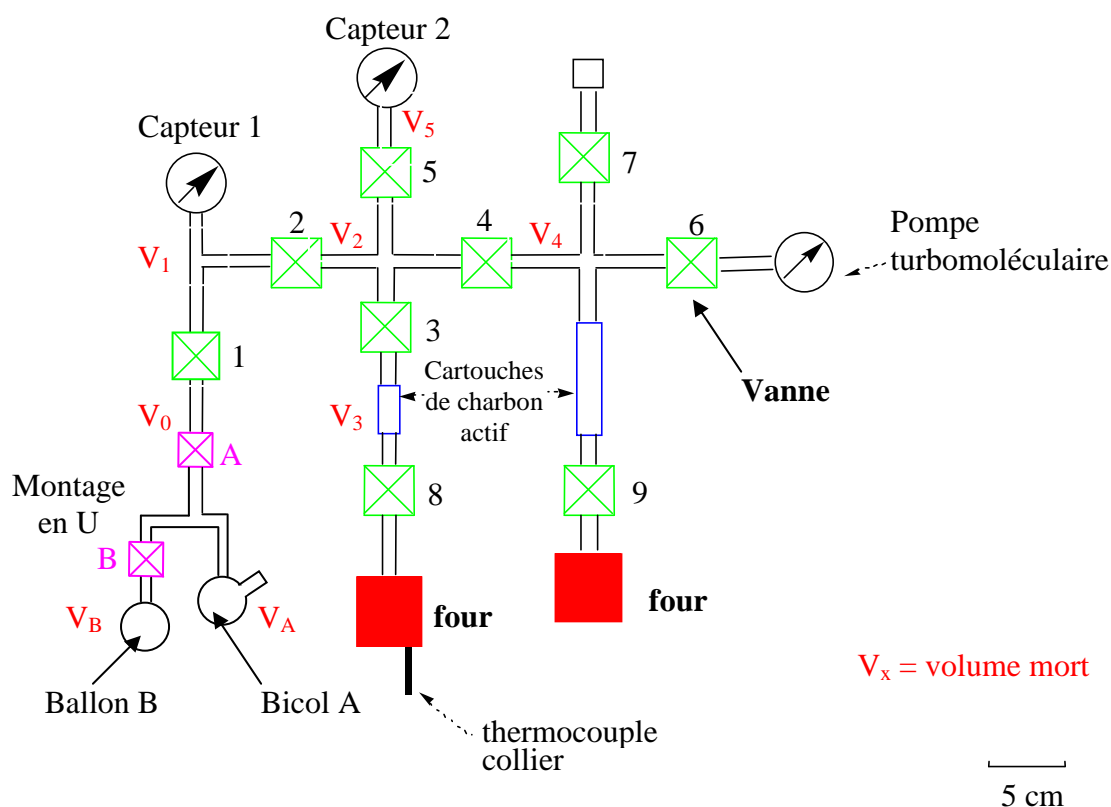


Figure IV-3 Représentation schématique du banc de tritiation avec le montage nécessaire pour la synthèse de ^3H -BPASS.

Afin d'obtenir un agent de réparation ^3H -BPASS avec une bonne activité spécifique, il est très important de réaliser la manipulation dans des conditions les plus anhydres possibles.

• Montage

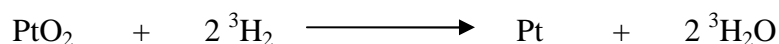
Le PtO_2 anhydre (25,2 mg, 0,11 mmole) est placé avec un barreau aimanté dans un bicol A de 10 mL fermé à une de ses extrémités par un septum. Environ 2 mL de THF anhydre sont versés dans le ballon B avec un barreau aimanté et 20 mg de LiAlH_4 sont ajoutés. Les deux ballons, aux rodages graissés, sont fixés sur une pièce en U en verre présentant deux vannes (A et B), elle-même fixée sur le banc de tritiation (Figure IV-3).

- **Transfert du THF anhydre**

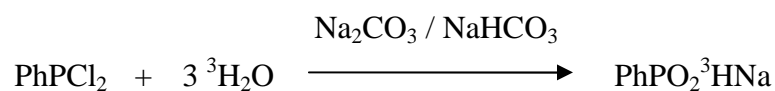
Le THF dans le ballon B est séché pendant une heure sous agitation avec LiAlH_4 pour s'assurer qu'il est totalement anhydre. La vanne B étant fermée, le reste du montage est mis sous vide à 0,001 mBar. Puis, le THF est gelé avec de l'azote liquide, la vanne B est ouverte et le ballon B est mis sous vide. Le montage en U est mis sous vide statique en fermant la vanne A. Le bicol A est congelé à l'azote liquide et le ballon B est chauffé pour permettre le transfert d'environ 1 mL de THF anhydre dans le bicol A contenant le PtO_2 . Une fois le transfert terminé, la vanne B est fermée, et le bicol A est gelé et mis sous vide.

- **Génération de l'eau tritiée de ultra haute activité (> 99 %) et synthèse de ^3H -BPASS**

Le montage est mis sous atmosphère de gaz tritium (1 bar). Quant le THF est décongelé, le PtO_2 est réduit en $^3\text{H}_2\text{O}$ sous agitation pendant 30 min.



Le composé PhPCl_2 (10 μL , 74 μmol), prélevé en boîte à gants sous atmosphère d'azote, est ensuite ajouté en utilisant une micro-seringue Hamilton et le mélange de réaction est agité pendant 1 heure.



La suspension est gelée dans l'azote liquide et l'atmosphère de tritium est évacuée et piégée dans le four revenu à température ambiante sur un lit de La/Ni/Mn puis le montage est placé sous N_2 .

20 mg de Na_2CO_3 solide (, 0,19 mmol) sont ajoutés au mélange de réaction, laissé en agitation pendant 10 min et ensuite une solution aqueuse de NaHCO_3 (16 mg, 0,19 mmol) (pH 7,5) est ajoutée. Le mélange résultant est filtré à travers un filtre Millex-FH 45 μm , et le bicol A et le filtre sont rincés avec 2 fois 1 mL de THF. La solution est évaporée sous pression réduite. Le résidu est dissous dans 2 mL d'eau et évaporé à sec. Cette procédure est répétée 3 fois pour éliminer les atomes de tritium échangeables. Le solide est dissous dans l'eau (10 mL) et un aliquot est prélevé et compté par scintillation liquide indiquant une activité volumique autour de 3,7 GBq.mL^{-1} .

- **Purification de ^3H -BPASS**

Le mélange brut est purifié et le tampon échangé par HPLC sur une colonne semi-préparative (Thermohypersil Keystone Hypurity C18, 100 Å, 5 µ, 250*10 mm). L'éluant utilisé est du tampon phosphate (NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4) 10 mM pH 7,2, et le débit est réglé à 2 mL.min⁻¹. La détection de ^3H -BPASS se fait avec un double système UV à 248 nm (Détecteur Merck L-4200 UV-Vis) et radioactif (Berthold Nuclear Spectrometer LB2040). Le composé est obtenu avec une pureté radiochimique de 98% (t_R = 23,2 min). L'éluant est évaporé sous vide et le composé désiré est dissous dans l'eau (20 mL). La quantité de produit est déterminée par UV et la quantité de radioactivité associée par scintillation liquide, pour donner l'activité spécifique. Celle-ci a été variable suivant les synthèses entre 204 et 629 GBq.mmol⁻¹. La solution finale est diluée à une concentration de 37 MBq.mL⁻¹ et tamponné avec du tampon phosphate 10 mM à pH 7,2 ou 7,8 suivant les expériences menées. Le composé est conservé à 4°C dans ces conditions.

- **RMN ^1H et ^3H de ^3H -BPASS**

Les RMN ^1H et ^3H sont enregistrées respectivement à 300 et 320 MHz sur un spectromètre Bruker AC 300 MHz. Les déplacements chimiques sont mesurés en partie par million (ppm) relatif au signal résiduel du proton de l'oxyde de deutérium (D_2O ; Euriso-top France) 4.67 ppm (^1H).

Une solution de ^3H -BPASS (200 µL, 370 MBq) dans D_2O (100 µL) est analysée.

RMN ^1H (D_2O , 300 MHz) δ (ppm): 7,45 (d, $^1J_{\text{P-H}}$ = 561 Hz, 1H, PH), 7,4-7,7 (m, 5H, PH)

RMN ^3H (D_2O , 320 MHz) δ (ppm): 7,54 (d, $^1J_{\text{P-3H}}$ = 525 Hz)

IV.B Production de radicaux hydroxyle

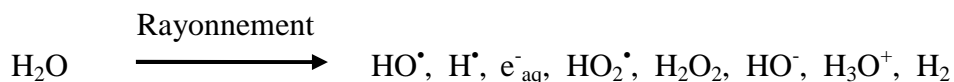
IV.B.1 Deux sources de HO^\bullet : le LINAC ou l'autoradiolyse de l'eau tritiée

Les principes sont décrits dans le chapitre II.

a. Génération des HO^\bullet

Les radicaux hydroxyle sont générés soit par des rayons β^- ou par un faisceau linéaire d'électrons accélérés par radiolyse de l'eau (Équation 5). Les rayons β^- sont obtenus de l'eau

tritiée (18.5 GBq.mL^{-1} , 61 Gy.h^{-1}). Un faisceau d'électrons de 10 MeV est fourni par le canon à électrons LINAC à Saclay (Laboratoire de Radiolyse). Généralement, dans nos expériences, la durée d'impulsion est de 10 ns (20 Gy par impulsion) et la fréquence de 0,4 Hz. Dans le cas contraire, la dose et la fréquence sont précisées.



Équation 5 Radiolyse de l'eau

La concentration en HO^\bullet générée peut être calculée en fonction du temps pour l'autoradiolyse de l'eau tritiée ou en fonction du nombre d'impulsions dans le cas de l'accélérateur d'électrons, dont la dose est déterminée par dosage chimique communément utilisé en chimie des radiations: le dosage de Fricke [292]. L'énergie déposée sur les échantillons est appelée *dose* et est exprimée en Gy ou J.Kg^{-1} .

Pour rendre compte de l'aspect temporel, on définit le débit de dose D^\bullet comme l'énergie fournie à la matière par unité de temps. Le débit de dose de l'eau tritiée est exprimé en Gy.h^{-1} . La concentration en HO^\bullet (μM) est directement liée à la dose (Gy) selon la relation suivante :

$$[\text{HO}^\bullet] = \text{D}^\bullet (\text{Gy.h}^{-1}) \times G_{(\text{HO}^\bullet)} (\text{mmol.J}^{-1}) \times 0,104 \times t (\text{h}) \quad (\text{en } \mu\text{M})$$

$G_{(\text{HO}^\bullet)}$ correspond au rendement en HO^\bullet en présence de N_2O égal à $5,6 \text{ mmol.J}^{-1}$ multiplié par le coefficient de conversion 0,104 [206]. Le facteur t représente le temps en heure (h).

L'énergie déposée sur les échantillons par les rayons β^- ou par le faisceau d'électrons accélérés correspond, en condition anaérobie saturée en N_2O , à une concentration en radicaux d'environ $35 \mu\text{M.h}^{-1}$ et $11 \mu\text{M}$ par impulsion, respectivement.

b. Optimisation de la production en HO^\bullet

Un pH proche de celui du physiologique est choisi (pH 7,2 ou 7,8) pour travailler avec des protéines. A ces deux pH, et plus particulièrement à pH 7,2, l'équilibre est déplacé dans le sens de la production d'électrons hydratés (Figure IV-4). De plus, à ce pH quasiment neutre, les formes H^+ et HO^- sont présentes à des concentrations très faibles de l'ordre de 100 nM.

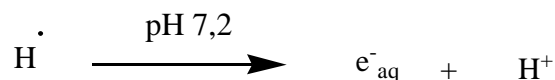


Figure IV-4 Production majoritaire d'électron aqueux par rapport aux atomes d'hydrogène radicalaires à pH physiologique.

En travaillant en milieu anaérobie avec du gaz N₂O, la production de HO[•] et de HO⁻ est favorisée au détriment des électrons hydratés qui ont tendance à provoquer la désamination réductive des acides aminés (Figure IV-5). Le N₂O permet de doubler le rendement en HO[•] et d'éviter ce type de réactions secondaires. Ceci a notamment été montré lors des travaux d'Anderson qui n'observe aucune désamination des acides aminés et peptides par spectrométrie de masse [204]. Dans ces conditions, les radicaux hydroxyle sont l'espèce majoritaire dans le milieu.

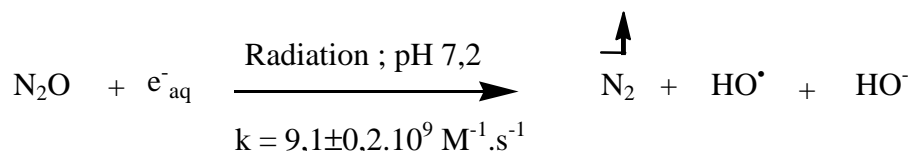


Figure IV-5 Transformation des électrons aqueux en radicaux hydroxyle en présence de N₂O à pH 7,2 [293]

IV.B.2 Calibration de la dose générée avec le LINAC : Dosage de Fricke

a. Principe

La dosimétrie Fricke est une dosimétrie chimique à l'aide d'une solution de sulfate ferreux. La radiation oxyde les ions ferreux (Fe²⁺) en ions ferriques (Fe³⁺) [292]. La quantité d'ions ferriques est mesurée par spectroscopie d'absorption de la lumière à 304 nm. La mesure est linéaire de 40 à 400 Gy. La dosimétrie de Fricke est dépendante du type de radiation et du débit de dose.

La concentration en Fe³⁺ mesurée au cours des expériences peut être calculée à partir de l'absorbance par la loi de Beer Lambert. Puis connaissant le rendement du dosimètre de Fricke en milieu aéré pour les électrons accélérés, il est possible de calculer la dose déposée dans l'échantillon en fonction de l'absorbance mesurée de Fe³⁺ qui est donnée par l'expression suivante :

$$\text{Dose (Gy)} = \frac{N \times A \times 100}{\epsilon \times 10^3 \times G(\text{Fe}^{3+}) \times f \times \rho \times l}$$

où N est le nombre d'Avogadro ($6,02.10^{23}$ molécules.mol⁻¹) ; A est l'absorbance de Fe³⁺ mesurée à 304 nm ; ϵ est le coefficient d'extinction molaire de Fe³⁺ à 304 nm de 2212 M⁻¹.cm⁻¹ à 26°C ; G(Fe³⁺) est le rendement en Fe³⁺ de 15,3 molécules.100eV⁻¹ ; f est égale à $6,24.10^{15}$ eV.Gy⁻¹ ; ρ est la densité de la solution irradiée et est égale à 1,024 pour une solution à 0,4 M en H₂SO₄ ; l est la longueur du chemin optique de 1 cm.

Cette dosimétrie permet de déterminer le nombre de Gy par impulsions.

b. Expérience

Une solution de 50 mL au final est réalisée en mélangeant 0,0196 g de sel de Mohr (1.10^{-3} M), avec 1,35 mL d'une solution doublement distillée de H₂SO₄ (0,4 M), de l'eau ultrapure aérée à 18,2 mM et 0,0029 g de NaCl (10^{-3} M). Une solution de 1 mL est irradiée puis analysée à 304 nm.

nombre d'impulsions	DO (1/4)	DO	D (Gy)	Dose par impulsion (Gy)
5	0,095	0,38	106	21
10	0,206	0,824	230	23
15	0,304	1,216	340	23
20	0,385	1,54	430	22

Tableau IV-1 Exemple d'un dosage de Fricke.

La dose calculée est de 22 Gy.impulsion⁻¹ dans cet essai et plus généralement de 20 Gy.impulsion⁻¹ lors de nos expériences.

IV.B.3 Descriptif du canon à électron (LINAC)

La fréquence de l'onde radio assurant la modulation du faisceau d'électrons est de 3 GHz (soit une longueur d'onde de 10 cm). L'onde est générée par un klystron situé en amont du canon à électrons (partie modulateur), puis véhiculée par un guide d'onde en cuivre jusqu'au canon à électrons. Les électrons sont focalisés à la sortie du canon puis accélérés par l'onde, les huit bobines de Helmholtz participant à l'accélération et à la conservation du groupage

électronique (Figure IV-6). Après la partie accélération vient la partie de gestion du faisceau : des quadripôles (deux aimants croisés) servent à focaliser et mettre en forme le faisceau.

L'énergie des électrons accélérés par le LINAC du laboratoire est limitée à 10 MeV pour éviter l'activation de la matière, mais reste suffisamment élevée pour que le faisceau puisse pénétrer la matière (notamment les milieux aqueux sur plusieurs millimètres en gardant une bonne homogénéité). L'énergie de 10 MeV permet aussi de traverser sans trop grande perte d'énergie la paroi de la jaquette en inox de 3 mm d'épaisseur et la paroi en verre du flacon utilisée lors des expériences. Un dosage de Fricke a été réalisé pour contrôler la concentration en HO^\bullet générée dans nos solutions.



Figure IV-6 Photo de l'accélérateur linéaire d'électrons (LINAC).

Le rayonnement secondaire présent dans l'enceinte est principalement constitué de rayons X et son intensité nécessite une protection par des blocs de béton de 1 m, renforcés par endroits par des briques en plomb.

Nous avons choisi des impulsions de 10 ns sur une gamme de fréquences entre 0,01 et 24 Hz, en travaillant habituellement avec 0,4 Hz.

Les séances d'exposition des échantillons au faisceau d'électrons accélérés ont nécessité la réalisation d'une jaquette de protection en aluminium pour éviter tout risque de problème de contamination de la pièce contenant le LINAC ou lors du transport des échantillons.

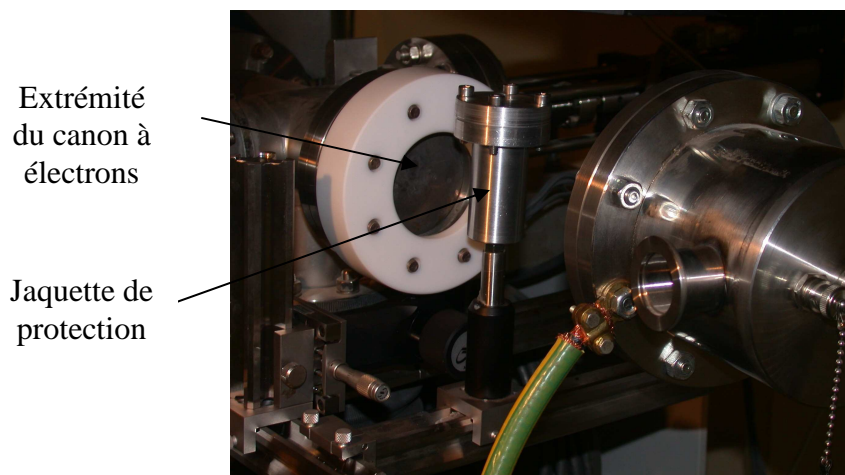
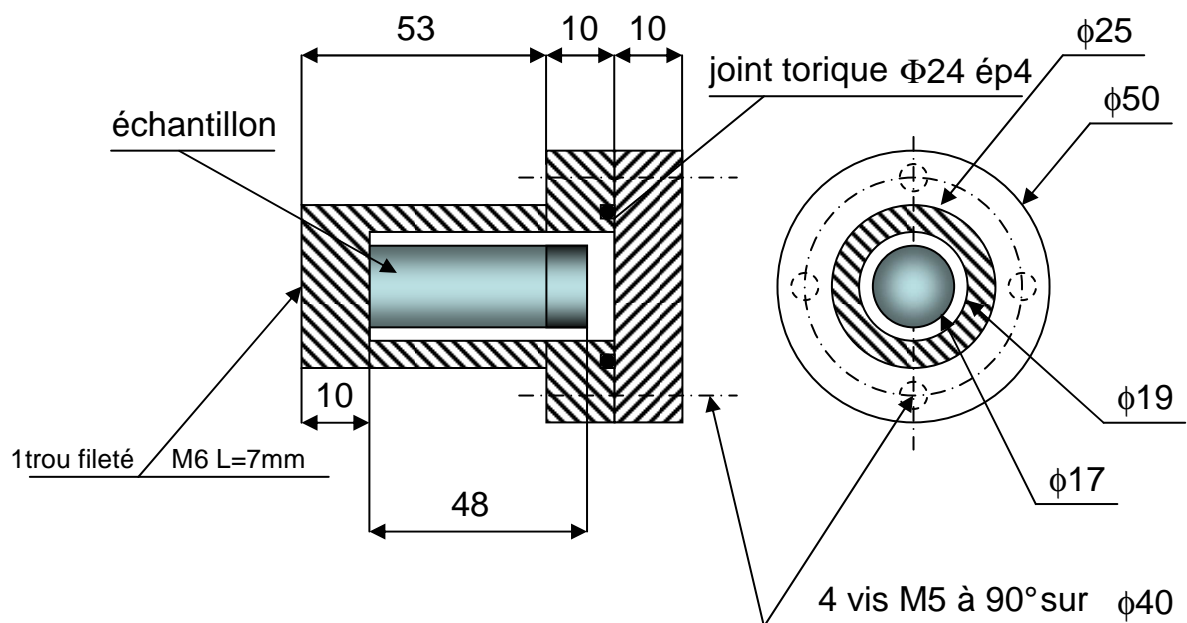


Figure IV-7 Jaquette de protection en inox installée sur son socle et alignée devant le canon à électron

Le plan de la jaquette est représenté ci-dessous ainsi que la procédure de radioprotection relative au transport et à l'irradiation de l'échantillon.

IV.B.4 Schéma de la jaquette de protection

Tous les échantillons en solution contenant de la radioactivité sont placés dans un flacon en verre de 4 mL avec un bouchon à vis et un septum. Ce flacon est ensuite placé dans la jaquette en aluminium décrite ci-dessous, présentant un joint torique permettant son étanchéité.



Tolérance générale = $\pm 0,1$ mm

Imaginé au DSM/DRECAM/SCM/Laboratoire de Radiolyse

Figure IV-8 Plan de la jaquette de protection en aluminium



Figure IV-9 Photo de la jaquette de protection en aluminium et du flacon en verre de 4 mL fermé par un bouchon à vis et un septum, utilisés lors de l'irradiation.

IV.B.5 Procédure d'irradiation d'échantillons tritiés avec le LINAC

Cette procédure a été validée par les personnes compétentes du service de radioprotection (SPR) du CEA.

- **Les échantillons**

Les solutions tamponnées contenant des peptides et/ou protéines et un marqueur tritié devront :

a) contenir chacun moins de **370 MBq.mL⁻¹** du composé tritié.

b) être conditionnés en source scellée (flacon en verre fermé par un bouchon à vis et septum) possédant une deuxième barrière d'étanchéité en aluminium (épaisseur 3 mm, couvercle boulonné sur joint torique)

Une étiquette mentionnant la présence de radioactivité dans l'échantillon sera apposée sur la jaquette en aluminium.

- **Les étapes**

L'irradiation de chaque échantillon se décomposera en **7 étapes** :

L'échantillon à irradier sera préparé au SCBM (bâtiment 547).

La quantité totale de radioactivité sera mesurée par scintillation liquide. Le résultat de ce comptage sera transmis à l'agent SPR et noté sur un cahier de suivi.

L'agent SPR réalisera un contrôle de non-contamination surfacique avant chaque transfert au bâtiment 546.

Le transport se fait en voiture personnelle (la quantité limite transportable par voiture personnelle est de 1000 MBq).

L'arrivée de l'échantillon dans le bâtiment 546 sera consignée dans un cahier de suivi.

Après irradiation (les molécules tritiées restent en solution sans dégagement gazeux), l'agent SPR procédera à un contrôle de non-contamination surfacique. Durant ce contrôle, l'échantillon sera conservé dans la pièce 35 du bâtiment 546.

Après accord de l'agent SPR l'échantillon sera transféré au bâtiment 547 et son départ consigné dans le cahier de suivi.

IV.C Le séquenceur d'Edman

IV.C.1 Le Principe

Le séquençage automatique se déroule séquentiellement acide aminé par acide aminé, de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale, selon la dégradation d'Edman (Figure IV-10).

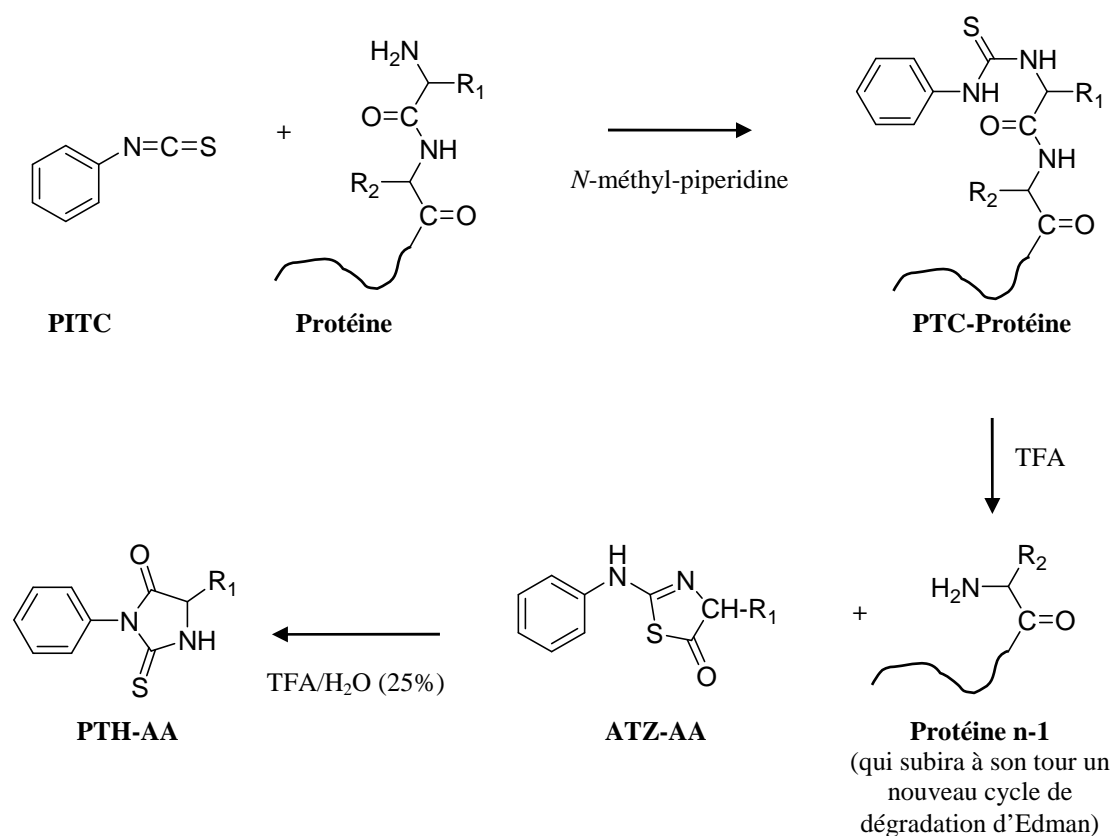


Figure IV-10 Dégradation d'Edman. (A) Réaction de couplage ; (B) Réaction de clivage ; (C) Réaction de conversion. Phénylisothiocyanate (PITC); Phénylthiocyanate (PTC); anilo-thiazoline (ATZ); phényl thio-hydantoin (PTH).

En présence de *N*-méthyl pipéridine, le Phényl-Iso-Thio-Cyanate (PITC) se couple aux fonctions amines primaires et secondaires des protéines (PTC-protéine). Le temps de réaction à 45°C est de 18 minutes. La liaison peptidique adjacente est fragilisée ce qui permet sa coupure en 3 minutes par l'acide trifluoroacétique (TFA) pur générant ainsi l'anilo-thiazoline (ATZ) du premier acide aminé (AA) et la protéine ayant perdu le premier AA. L'ATZ est extrait du milieu réactionnel et converti en milieu acide (TFA à 25 % dans l'eau) en phényl thio-hydantoin (PTH-AA) plus stable.

La réaction d'Edman produit aussi les produits de dégradation suivant (Figure IV-11) :

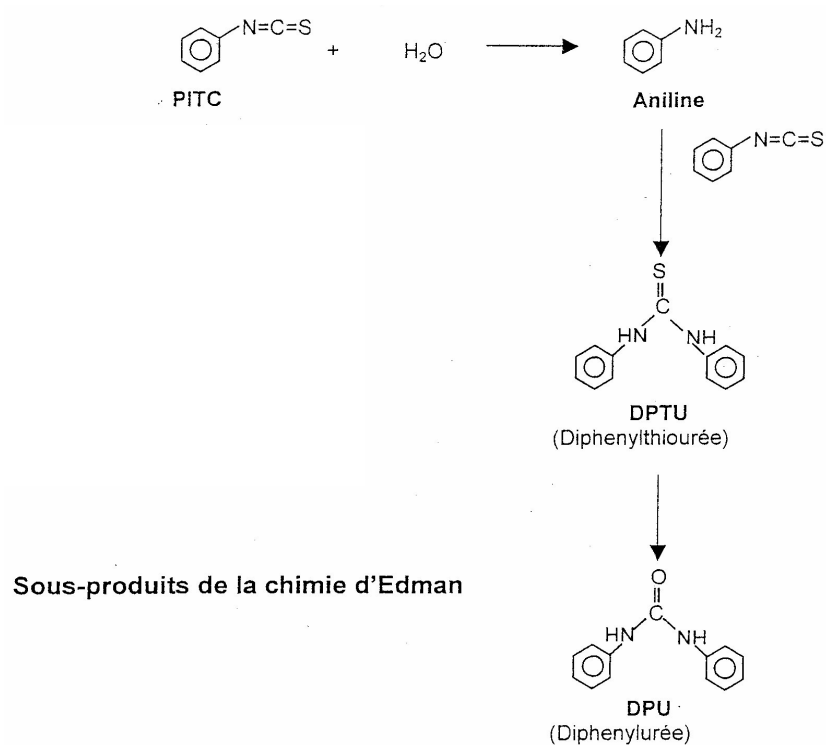


Figure IV-11 Les sous-produits de la dégradation d'Edman

Le PTH-AA plus stable peut donc être analysé par HPLC et sa nature déterminée grâce à un étalon de PTH-AAs (Figure IV-12). Le cycle de réaction peut être répété et conduit ainsi à la séquence de la protéine.

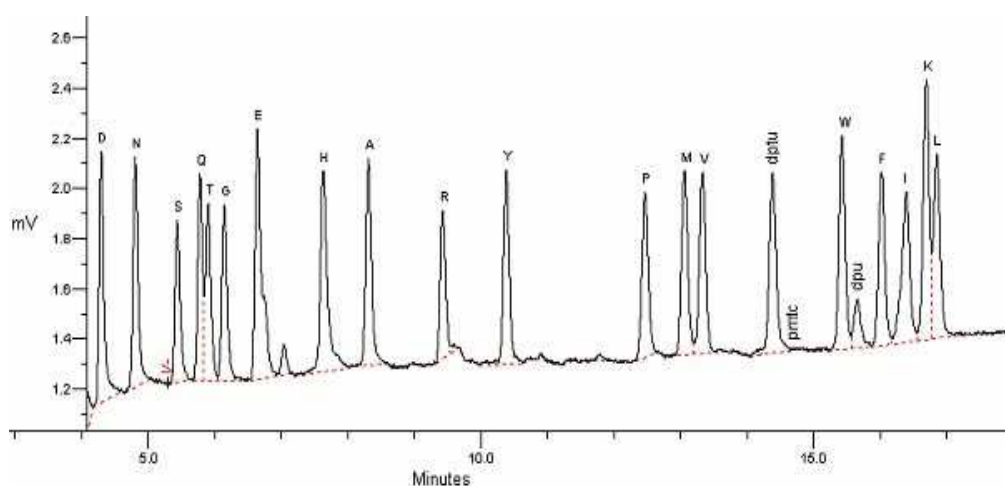


Figure IV-12 Le profil d'élution HPLC du mélange de 19 acides aminés dérivatisés standards, permettant d'établir les temps de rétention. Dptu = diphenylthiourée.

IV.C.2 Descriptif du matériel

Le séquençage est fait sur le séquenceur de peptide ABI 492 HT/ Procise d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) avec une acquisition sur le Procise 1.1 et le logiciel Model 610A 1.1 (Figure IV-13).



Figure IV-13 Séquenceur ABI 492 HT/ Procise d'Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Tous les produits sont disponibles commercialement (Perkin Elmer) et les PTH-amino acides sont collectés en utilisant le collecteur de fraction Gilson FC 203B.

IV.D Le compteur de scintillation liquide

Les techniques de mesure d'activité par scintillation liquide sont apparues il y a une cinquantaine d'années. Ces techniques consistent à mélanger la solution radioactive à mesurer à un liquide scintillant et à transformer les rayonnements ionisants, consécutifs aux désintégrations ou désexcitation des atomes radioactifs, en rayonnements lumineux, détectables et quantifiables. La scintillation liquide est une des seules méthodes permettant de mesurer l'activité de radionucléides bêta purs de faible énergie (Figure IV-14).

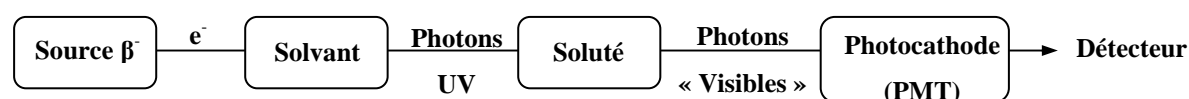


Figure IV-14 Principe des scintillateurs liquides

Les liquides scintillants sont des transformateurs de rayonnements ionisants en lumière. Ils sont composés d'un solvant aromatique de la famille du benzène et d'un ou deux solutés. Le solvant solubilise les substances et absorbe l'énergie du rayonnement β^- . Cette énergie est libérée par fluorescence mais ce rayonnement réémis dans l'UV ne peut être utilisé ainsi. Il est donc nécessaire d'ajouter un soluté. Les solutés, de nature aromatique également, sont riches en doubles liaisons. Suite à leur excitation, le retour à l'état fondamental émet également un rayonnement fluorescent mais à une longueur d'onde plus grande (400 à 500 nm) reçu par la photocathode du photomultiplicateur (PMT).

La détection se fait grâce aux photomultiplicateurs. Après absorption de la lumière, les PMT émettent au moyen d'une photocathode des électrons. Ces électrons sont ensuite accélérés par un champ électrique et multipliés (Figure IV-15).

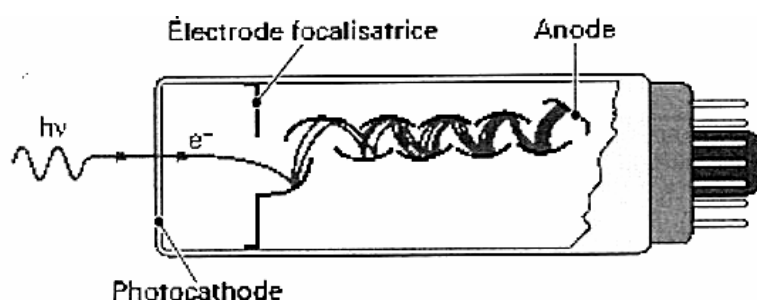


Figure IV-15 Principe d'un photomultiplicateur (PMT)

L'amplitude des signaux délivrés par les photomultiplicateurs est proportionnelle au nombre d'électrons émis par la photocathode.

IV.E Purification des échantillons par HPLC

Les acides aminés dansylés, les peptides et les protéines sont purifiés après marquage sur colonne HPLC analytique ou semi-préparative avec une pompe Merck Hitachi L-7100 utilisant le système de dégazage Degazys DG-1310 UnifLows, un détecteur UV-Vis SPD-10A VP Shimadzu et un détecteur par scintillation liquide Radioflow LB509 avec le cocktail de scintillation Quickszint Flow 302. L'acquisition des données se fait *via* le logiciel de chromatographie Borwin.

IV.F Scintillation liquide et mesure de la radioactivité par HPLC

A la détection UV est associée la détection de la radioactivité par scintillation liquide. La Figure IV-16 ci-dessous représente le montage de la chaîne HPLC :

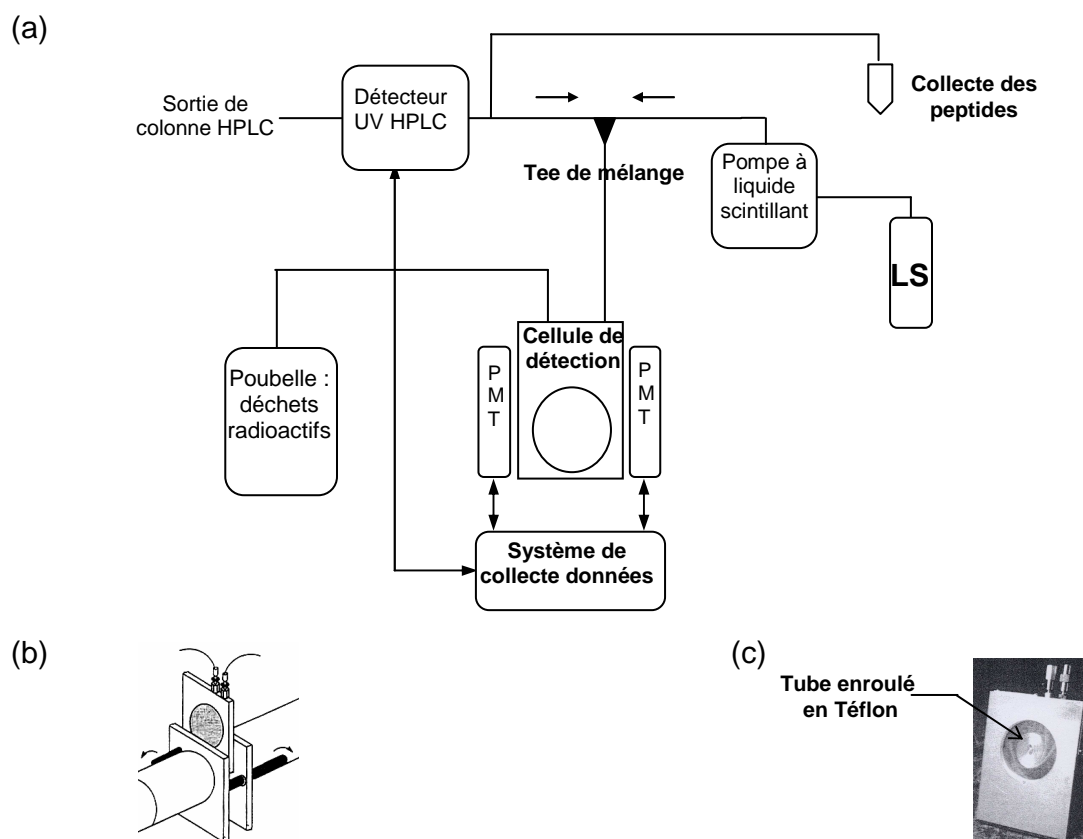


Figure IV-16 Schéma simplifié (a) du principe de détection de la radioactivité en HPLC (LS : Liquide scintillant). b) Disposition des photomultiplicateurs vis à vis de la cellule de détection. c) Cellule de détection

Comme le montre le schéma ci-dessus, l'échantillon analysé par HPLC est, après sa sortie du détecteur UV, mélangé avec le liquide scintillant. Il traverse une cellule de détection constituée d'un tube en téflon enroulé. La cellule se trouve insérée entre deux photomultiplicateurs.

IV.G Protocole d'identification des radicaux sur les acides aminés

Des expériences de mises au point ont été réalisées selon le protocole suivant à l'identique, en testant 25, 50 et 100 impulsions sur le mélange Phe + Leu, et 25 impulsions sur

Asn + Leu. Ces expériences ont amené à choisir le nombre de 25 impulsions pour réaliser l'échelle de réactivité selon le protocole suivant :

- **Réaction de marquage au tritium avec le LINAC**

Les composés suivants sont introduits dans un flacon scellé de 1 mL :

- tampon phosphate 10 mM pH 7,8 (890 μ L)
- deux acides aminés (X + Leu) (2*5 μ L à 20 mM dans l'eau ultrapure), excepté pour la tyrosine (100 μ L de Tyr 1 mM + 5 μ L de Leu 20 mM avec 795 μ L de tampon phosphate)
- ^3H -BPASS (0,5 μ eq.) (100 μ L d'une solution à 1 mM et 514 MBq.mL⁻¹)

La solution résultante est dégazée en bullant pendant 30 min avec N₂O.

La solution est soumise au faisceau linéaire d'électrons accélérés (25 impulsions de 20 Gy à une fréquence de 0,4 Hz).

- **Filtration des échantillons**

Le mélange est ensuite lyophilisé et dissous dans l'eau (100 μ L). Afin d'éliminer 95 % de l'agent ^3H -BPASS, l'échantillon est passé à travers une résine acide échangeuse de cations Dowex 50 W*8 (conditionné avec 1 mL d'HCl 1 N et 3 fois 100 μ L d'HCl 10⁻² N) :

- dépôt de l'échantillon
- lavage avec 4 mL d'une solution de HCl 10⁻² N
- élution avec du NH₄OH 10⁻¹ N (8 à 12 mL en fonction du pKa de l'acide aminé).

Les fractions d'acides aminés sont regroupées et évaporées à sec.

- **Dansylation des acides aminés**

Les acides aminés sont dansylés avec le chlorure de dansyle (DsCl) (25 μ L d'une solution 20 mM dans l'acétone) dans NaHCO₃ pH 8 (0.5 M, 25 μ L) pendant 1 heure à 37 °C.

Les échantillons sont séparés en deux. Un traitement acide (TFA 10% v/v) est réalisé sur une des moitiés pendant 15 heures pour libérer les atomes de tritium labiles et les deux échantillons (sans ou avec TFA) sont ensuite lyophilisés.

- **Détermination de l'activité spécifique sur HPLC analytique**

Les échantillons sont ensuite analysés par HPLC sur une colonne analytique (Agilent Zorbax, C18, 80 Å, 4,6*250 mm) avec le système d'élution suivant A: 0,1 M NH₄HCO₃ / ACN 90/10, éluant B: 0,1 M NH₄HCO₃ / ACN 55/45 en utilisant différents gradients (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Le débit de l'éluant est réglé à 1 mL.min⁻¹ et le débit du scintillant à 1,8 mL.min⁻¹, à température ambiante avec une détection UV à 247 nm.

Ds-Acides aminés	% de B	Tr aa (min)	Tr Leu (min)
Acide aspartique	0%-100% B 30 min	9,6	22,8
Acide glutamique	0%-100% B 30 min	10,1	22,9
Alanine	0-100% B 30 min	18,3	23,5
Arginine	15% B 15 min 15%-100% B 30 min	20,8	29,3
Asparagine	0-100% B 60 min	17,2	34,1
Cystéine	0%-100% B 30 min	24,8	22,5
Glutamine	0%-100% B 30 min	14,5	22,7
Glycine	0%-100% B 30 min	16,9	22,8
Histidine	0%-100% B 30 min 100% B 40 min	32,2	22,4
Isoleucine	0%-30% B 10 min 30% B 30 min 30-40% B 40 min 40% B 50min	43,8	45,4
Lysine (Ds) ₂	0%-100% B 30 min 100 % B 45 min	32,8	23,3
Méthionine	0-100% B 30 min	22,2	23,4
Phénylalanine	0%-100% B 30 min	25	23,4
Proline	0%-100% B 30 min	18,9	23,5
Sérine	15% B 20 min 15%-80% B 35 min 80%-100% B 40 min	20	35,8
Thréonine	15% B 20 min 15%-80% B 35 min 80%-100% B 40 min	23,8	35,6
Tryptophane	0-100% B 30 min	23,5	22,3

Tyrosine	0%-50% B	20 min	20,4	26,9
	50% B	35 min		
	50-100% B	50 min		
valine	0%-100% B	30 min	20,8	23,1

Tableau IV-2 Gradient d'élution pour chacun des Ds-AA + Ds-Leu et les temps de rétention.

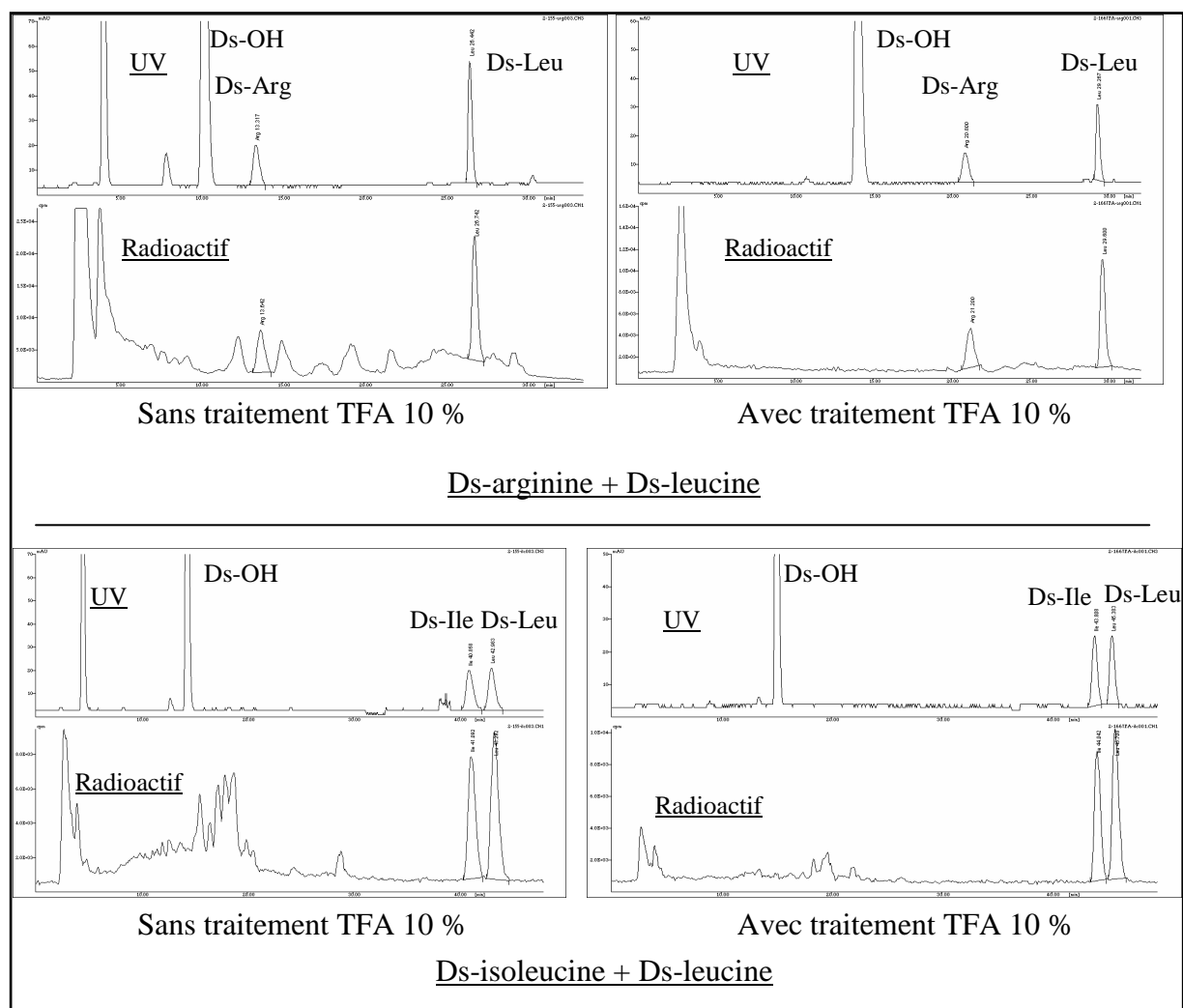


Figure IV-17 Exemples des chromatogrammes des échantillons Arg+Leu et Ile+Leu traités marqués au tritium et dansylés avec ou sans traitement acide TFA 10 %. Les séparations sont réalisées selon les gradients décrits dans le Erreur ! Source du renvoi introuvable. à l'exception de l'échantillon (Arg+Leu) non traité TFA 10 % dont le gradient est de 0 à 100 % B en 30 min.

Les activités spécifiques (Bq.nmol^{-1}) sont déterminées en divisant l'aire du pic radioactif par l'aire du pic UV. L'aire du pic radioactif est standardisé en injectant une quantité connue de radioactivité, alors que les pics UV sont standardisés en injectant une quantité connue de chaque acide aminé dansylé (soit commercialement disponible, soit synthétisé dans notre

laboratoire). Pour chaque acide aminé, les activités spécifiques sont normalisées en utilisant la leucine comme standard interne.

IV.H Protocole général de mesure de l'activité spécifique des PTH-acides aminés

L'activité spécifique de chacun des acides aminés, obtenus suite au séquençage des peptides, est déterminée selon le protocole suivant :

a. Séquençage des peptides avec le séquenceur d'Edman

Les filtres, servant à ancrer le peptide, sont préparés en déposant 15 µL d'une solution commerciale Biobrene Plus et séchés sous flux d'argon. Cinq à dix nmoles de peptides purifiés par HPLC sont déposées sur ces filtres.

Le nombre de cycles est programmé sur le logiciel Procise 1.1 en fonction du nombre d'acides aminés du peptide, en ajoutant 3 cycles de plus correspondant à 2 blancs et à 1 standard. Le programme « PL collect » est activé et lance la collecte automatique au cycle 3 correspondant au premier PTH-AA.

Le collecteur de fraction Gilson est préalablement réglé comme suit :

- Collecte par pente : largeur du pic à mi-hauteur = 0,3 min et hauteur du pic = 0,5 mV
- Delay time = 0,29 min
- Nombre de tubes (eppendorf) par cycle = 8 ; N° rack = 0
- Collecte des pics positifs et négatifs entre 2,8 min et 20 min
- Collecte max par tube = 4,5 min

En parallèle, l'enregistreur de pics UV est mis en marche.

Les PTH-AA collectés sont analysés en UV de la manière suivante :

b. Détermination de la quantité de matière de PTH-AA avec un spectrophotomètre UV.

Les PTH-AA collectés dans des tubes eppendorf sont lyophilisés puis repris dans 100 µL d'une solution A éthanol/eau 50/50 (v/v), vortexés et centrifugés.

Le blanc utilisé pour l'analyse UV est fait avec une solution de Premix¹⁵ à 2,7% dans éthanol/eau 50/50 (v/v). Les échantillons sont analysés dans une cuve en quartz (Hellma®) de 50 µL et de 1 cm de trajet optique, avec une analyse UV réalisée en mode balayage entre 240 et 320 nm. Les PTH-AA absorbent vers 260 -270 nm et les coefficients d'extinction molaire utilisés, obtenus dans l'éthanol, sont référencés dans le tableau suivant [294].

PTH-AA dérivés de :	Coefficient d'extinction molaire	Longueur d'onde max
Acide aspartique	16100	268,5
Acide glutamique	16000	269
Alanine	16100	268,5
Arginine	14600	265
Asparagine	18000	269,5
Glutamine	14000	269,5
Glycine	14500	267,5
Histidine	15100	265,5
Isoleucine	15600	269,5
ε-PTC Lysine	29100	270
Méthionine	17900	270,5
Phénylalanine	15000	270,5
Proline	16000	271,5
Sérine	15500	269
Thréonine	16400	269,5
Tryptophane	17300	269,5
Tyrosine	16400	271
Valine	16200	270

Tableau IV-3 Récapitulatif des coefficients d'extinction molaire des PTH-AA obtenus dans l'éthanol 100 % [294].

La solution de PTH-AA est récupérée et la cuve rincée avec 2*200 µL de solution A. Les solutions de lavage sont ajoutées à la solution de PTH-AA pour comptage par scintillation. Après chaque analyse PTH-AA, la cuve UV est contrôlée pour vérifier qu'elle n'était pas

¹⁵ Le Premix est une solution commerciale ajoutée dans l'éluant A utilisé lors de l'analyse HPLC du séquenceur.

contaminée radioactivement. La cuve est séchée sous flux d'azote et une autre solution de PTH-AA peut être alors analysée.

c. Comptage par scintillation liquide de la radioactivité associée au PTH-AA

Les échantillons collectés (100 μL) sont dilués dans 4 mL de cocktail de scintillation Zinsser Analytic Unisafe 1 et le comptage est mené sur le compteur par scintillation liquide Wallac 1409 en utilisant le programme 1414 WinSpectral.

La solution de PTH-AA est transférée dans un tube de comptage de scintillation et 4 mL de scintillant sont ajoutés. La solution résultante est agitée vigoureusement et vortexée pour homogénéisation. Le comptage est réalisé sur le compteur par scintillation liquide Wallac 1409 pendant 2*5 min. Des contrôles sont réalisés systématiquement sur les solutions de lavages et celles utilisées pour reprendre les échantillons.

L'activité spécifique (Bq.nmol^{-1}) est obtenue en calculant le rapport nombre de Becquerel sur le nombre de nmoles.

IV.I Protocole d'identification des radicaux sur les peptides

IV.I.1 Protocole utilisant l'autoradiolyse de l'eau tritiée comme source d' HO^\bullet

a. Incorporation de tritium en fonction de la concentration cumulée en HO^\bullet

Ce protocole correspond à la Figure II-13.

- **Mélange réactionnel**

Un flacon de 1 mL fermé par un septum contenant de l'eau ultrapure (235 μL) est placé dans une boîte à gants. De l'eau tritiée est ajoutée avec une activité volumique finale de 18,5 GBq.mL^{-1} (555 μL de 33.3 GBq.mL^{-1} ; $[\text{HO}^\bullet]_{\text{cumulé}} = 35,3 \mu\text{M.h}^{-1}$) et la solution résultante est dégazée en bullant pendant 1 heure avec N_2O . L'aiguille est retirée de la solution et, sous un flux moyen de N_2O , le peptide LRRASLG (10 μL d'une solution à 10 mM dans l'eau ultrapure) est ajouté, suivi de l'agent ^3H -BPASS (144 μL d'une solution concentrée à 1 mM et à 514 MBq.mL^{-1} ; AS = 204 GBq.mmol^{-1}). La réaction a durée 20 h avec des prélèvements intermédiaires de 100 μL à 2,25 h, 4 h, 6 h et 19,75 h.

Le volume final de la solution tamponnée, 5 mM à pH 7,2, est de 1 mL, avec 100 μM de peptide, 144 μM en ^3H -BPASS (1,44 eq.), et des concentrations cumulées variables de HO^\bullet , 80 μM (0,8 eq.), 140 μM (1,4 eq.), 212 μM (2,1 eq.) et 700 μM (7 eq.).

- **Purification sur SepPack light C18 et traitement acide**

Les volumes de 100 μL qui sont prélevés à 2,25 h, 4 h, 6 h et 19,75 h, sont passés à travers une colonne SepPack light C18 (Waters) :

- lavage avec 5*1 mL d'eau (approximativement 95% de ^3H -BPASS sont éliminés)
- élution avec 1 mL de ACN/ H_2O /TFA 70/30/0,1

Cette fraction contenant le peptide est traitée avec 400 μL de TFA (10 % final) et laissé réagir pendant 24 heures à température ambiante. La solution est évaporée à sec et 100 μL d'eau ultrapure sont ajoutés.

- **Purification HPLC en phase inverse C18**

La solution résultante est purifiée par HPLC sur colonne analytique (Agilent Zorbax, C18, 300 Å, 4,6*250 mm) avec le système d'éluant A: H_2O / 0,1% TFA, éluant B: ACN/0,1% TFA selon le gradient ($t=0$ A/B (98/2) à $t=15$ min A/B (80/20); $t_R = 10$ min), à un débit de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, à 42°C, avec une détection UV à 210 nm et 264 nm

- **Séquençage du peptide**

Un aliquot de chacun des échantillons purifiés est déposé sur le séquenceur automatique (ABI Procise 492HT), et les PTH-AA sont collectés automatiquement et l'activité spécifique de chacun des acides aminés est mesurée à partir des données UV du séquenceur et par comptage par scintillation liquide (Wallac 1409).

b. Analyse de l'activité spécifique des peptides en mélange

Ce protocole correspond aux Figure II-14, Figure II-15 et Figure V-11.

- **Mélange réactionnel**

En boîte à gants, dans un flacon de 4 mL fermé par un septum, de l'eau tritiée est ajoutée avec une activité volumique finale de 31,8 $\text{GBq} \cdot \text{mL}^{-1}$ (1,72 mL de 37 $\text{GBq} \cdot \text{mL}^{-1}$; $[\text{HO}^\bullet]_{\text{cumulé}} = 121,6 \mu\text{M} \cdot \text{h}^{-1}$) et la solution résultante est dégazée en bullant avec N_2O pendant 30 min. L'aiguille est retirée de la solution et, sous un flux de N_2O , le mélange peptidique (Kemptide, β -Casomorphine, ACTH, Angiotensine, Oxytocine, Neurokinine A, Met₂-Deltorphine, Leu-

Valorphine-Arg) est ajouté (10 μL d'une solution à 5 mM dans l'eau ultrapure), suivi de l'agent ^3H -BPASS (200 μL d'une solution concentrée à 3,7 mM et à 1,27 GBq.mL⁻¹; AS = 344 GBq.mmol⁻¹). Le mélange réactionnel est laissé 8 h à température ambiante.

Le volume final de la solution, tamponnée à pH 7,2 (5 mM), est de 2 mL, avec 8*25 μM en peptides, 370 μM en ^3H -BPASS (1,85 éq.), et 486 μM cumulé en HO[•] (2,4 éq.).

- **Purification sur SepPack light C18 et traitement acide**

L'échantillon est ensuite passé à travers une colonne SepPack light C18 (Waters) selon le même protocole décrit ci-dessus. Puis, les peptides sont exposés sept fois, à température ambiante, à un traitement acide (TFA 10 % final) pendant une heure suivi d'une lyophilisation. Lors du dernier cycle, le lyophilisat est repris dans 100 μL d'eau ultrapure.

- **Purification HPLC en phase inverse C18**

Les huit peptides sont purifiés par HPLC sur colonne analytique (Agilent Zorbax, C18, 300 Å, 4,6*250 mm) avec le système d'éluant A: H₂O/ 0,1% TFA, éluant B: ACN/0,1% TFA, à un débit 1 mL.min⁻¹, à 42°C et une détection à 210 nm et 264 nm, avec le gradient suivant :

- 2 à 20 % de B de t= 0 à 20 min
- 20 à 25 % de B de 20 à 40 min
- 25 à 95 % de B de 40 à 50 min

t_R : Kemptide (10 min) ; Angiotensine (15,2 min) ; Oxytocine (18,0 min) ; ACTH (20,1 min) ; Neurokinine A (23,3 min) ; Leu-Valorphine-Arg (25,3 min) ; Met₂-Deltorphine (27,0 min) ; β -Casomorphine (29,8 min).

- **Séquençage des peptides**

Les quatre peptides suivants purifiés (Kemptide, Leu-Valorphine-Arg, β -Casomorphine et Angiotensine) sont séquencés sur le séquenceur automatique (ABI Procise 492HT), et les PTH-AA sont collectés automatiquement. La quantité de PTH-AA est mesurée par UV et l'activité associée par comptage par scintillation liquide (Wallac 1409) selon le protocole général (IV.C).

IV.I.2 Protocole utilisant le LINAC comme source d'HO[•]

a. Minimisation de la dégradation avec le LINAC

Dans un flacon de 4 mL fermé par un septum, 990 µL d'une solution d'acide phénylphosphinique (187 µM final) tamponnée à pH 7,2 à 5 mM sont ajoutés. La solution résultante est dégazée en bullant avec N₂O pendant 30 min. L'aiguille est retirée de la solution et, sous un flux de N₂O, le Kemptide (100 µM) est ajouté (10 µL d'une solution à 10 mM dans l'eau ultrapure). Le mélange réactionnel est irradié avec le LINAC avec les conditions suivantes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) :

Dose par impulsion (Gy)	Nombre d'impulsions	Fréquence (Hz)	Nombre équivalents HO [•]	Présence de ¹ H-BPASS
20	10	0,4	1,2	oui
20	30	0,4	3,5	oui
20	50	0,4	5,8	oui
20	100	0,4	11,6	oui
20	200	0,4	23,3	oui
10	100	0,4	5,8	oui
1	1000	0,4	5,8	oui
20	50	0,017	5,8	oui
20	50	0,17	5,8	oui
20	50	24	5,8	oui
20	50	0,4	5,8	non

Tableau IV-4 Variation des paramètres du LINAC (Fréquence, nombre d'impulsions, dose) et de la présence ou non de ¹H-BPASS.

Ces conditions testées sont représentées sur les histogrammes en annexe (figures dans l'annexe V.B.a).

b. Mise au point sur l'incorporation de tritium

Ce protocole correspond au chapitre V.B.b en annexe.

- **Mélange réactionnel**

Le protocole de préparation des solutions du mélange peptidique (Kemptide, Leu-Valorphine-Arg et RIP) est réalisé comme dans le paragraphe IV.I.2.c ci-dessous. Le volume final de la solution tamponnée à pH 7,2 (5 mM) est de 1 mL. Les peptides sont mis en présence de quantité variable de ^3H -BPASS puis sont soumis au faisceau d'électrons accélérés. Différents paramètres (dose, nombre d'impulsions, nombre d'équivalents en agent tritié) sont testés et sont récapitulés dans le tableau suivant (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**):

[peptides] μM	Dose par impulsion (Gy)	Nombre d'impulsions	Fréquence (Hz)	Nombre équivalents HO^\bullet	Nombre équivalents ^3H -BPASS
3*67	20	25	0,4	1,45	2,15
3*67	2	250	0,4	1,45	2,15
3*67	20	25	0,1	1,45	2,15
3*33	20	12	0,4	1,45	4,3

Tableau IV-5 Paramètres testés lors de la mise au point du marquage au tritium de peptides en mélange avec le LINAC.

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le paragraphe IV.I.2.c pour la purification sur SepPack light C18 et les traitements acides.

- **Analyse sur HPLC analytique en phase inverse C18**

Les huit peptides sont purifiés par HPLC sur colonne analytique (Agilent Zorbax, C18, 5 μm , 300 Å, 4,6*250 mm) avec le système d'élution A: H_2O / 0,1% TFA, éluant B: ACN/0,1% TFA, à un débit 1 mL.min⁻¹, à 42°C et une détection à 210 nm et 264 nm, avec le gradient suivant :

- 2 à 30 % de B de $t = 0$ à 20 min
- 30 à 50 % de B de 20 à 30 min
- 50 à 95 % de B de 30 à 40 min

t_R : Kemptide (10,0 min) ; Leu-Valorphine-Arg (20,5min) ; RIP (22,5 min).

Le rapport aire actif sur aire $\text{UV}_{210\text{nm}}$ est calculé pour chacun des pics et représenté sous forme d'histogramme dans la partie V.B.b en annexe.

c. Analyse de l'activité spécifique des peptides en mélange

Ce protocole correspond à la Figure V-10.

• Mélange réactionnel

Dans un flacon de 4 mL fermé par un septum contenant 470 μL d'eau ultrapure, 450 μL d'une solution de ^3H -BPASS (solution concentrée à 1,8 mM et à 660 MBq.mL⁻¹; AS = 344 GBq.mmol⁻¹) sont ajoutés, et la solution résultante est dégazée en bullant avec N₂O pendant 30 min. L'aiguille est retirée de la solution et, sous un flux de N₂O, le mélange peptidique (Kemptide, Leu-Valorphine-Arg, α -mating factor fragment 1-6, RIP, Laminine nonapeptide, Murine, peptide 10, Pneumadine) est ajouté (10 μL d'une solution à 5 mM dans l'eau ultrapure). Le mélange réactionnel est irradié avec le LINAC avec 50 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz.

Le volume final de la solution, tamponnée à pH 7,2 (5 mM), est de 1 mL, avec 8*50 μM en peptides, 800 μM en ^3H -BPASS (2 éq.), et 582 μM cumulé en HO[•] (1,45 éq.).

• Purification sur SepPack light C18 et traitement acide

L'échantillon est ensuite passé à travers une colonne SepPack light C18 (Waters) selon le même protocole décrit ci-dessus. Puis, les peptides sont exposés sept fois, à température ambiante, à un traitement acide (TFA 10 % final) pendant 1 heure suivi d'une lyophilisation. Lors du dernier cycle, le lyophilisat est repris dans 100 μL d'eau ultrapure.

• Purification HPLC en phase inverse C18

Les huit peptides sont purifiés par HPLC sur colonne analytique (Agilent Zorbax, C18, 300 Å, 4,6*250 mm) avec le système d'éluant A: H₂O/ 0,1% TFA, éluant B: ACN/0,1% TFA, à un débit 1 mL.min⁻¹, à 42°C et une détection à 210 nm et 264 nm, avec le gradient suivant :

- 2 à 20 % de B de t= 0 à 20 min
- 20 à 25 % de B de 20 à 40 min
- 25 à 95 % de B de 40 à 50 min

t_R : Kemptide (10,6 min) ; Pneumadine (16,0 min) ; Laminine nonapeptide (19,6 min) ; peptide 10 (24,0 min) ; Leu-Valorphine-Arg (25,9 min) ; Murine (28,2 min) ; RIP (30,2 min) ; α -mating factor fragment 1-6 (42,4 min).

• Séquençage des peptides

Le kemptide purifié est séquencé sur le séquenceur automatique (ABI Procise 492HT), et les PTH-AA sont collectés automatiquement. La quantité de PTH-AA est mesurée par UV et l'activité associée par comptage par scintillation liquide (Wallac 1409) selon le protocole général (IV.C).

IV.J Protocole d'identification des radicaux sur le peptide

H3₁₂₂₋₁₃₅ et sur Asf1₁₋₁₅₆

IV.J.1 Protocole de marquage du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅

Toutes les expériences pour la caractérisation des activités spécifiques du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ sont réalisées dans un flacon de 4 mL fermé par un septum, à 4°C, avec un tampon phosphate 10 mM à pH 7,9, avec un volume final de 1 mL, et en utilisant les solutions suivantes :

- une solution de tampon phosphate 10 mM pH 7,9 à 4°C
- une solution à 4°C re-concentrée de ³H-BPASS (1,4 mM et 720 MBq.mL⁻¹), d'activité spécifique 514 GBq.mmol⁻¹, tamponnée environ à 10 mM de phosphate pH 7,9.
- une solution à 4°C de peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ (2,8 mM) dans l'eau ultra pure.
- une solution à 4°C de protéine hAsf1₁₋₁₅₆ (560 μM)¹⁶ à 10 mM de phosphate pH 7,9.
- une solution à 4 °C d'apomyoglobine (560 μM)¹⁶ à 10 mM de phosphate pH 7,9.

Lors des déplacements hors du laboratoire, le flacon de 4 mL, contenant la solution radioactive de réaction, est placé dans une jaquette en aluminium étanche refroidie à 4°C et entreposé dans la glace¹⁷. La jaquette à 4°C permet de maintenir la température hors de la glace suffisamment longtemps pour réaliser les expériences d'irradiation avec le LINAC.

a. Calcul de la concentration de complexe théorique formé [RL]

La concentration de complexe théorique formée est déterminé avec l'équation suivante :

¹⁶ Suivant les lots de purification, les concentrations des solutions mères des deux protéines étaient situées entre 500 μM et 1 mM. Les volumes ajoutés à la solution de réaction sont ajustés en conséquence.

¹⁷ La réaction est réalisée à 4°C car l'apomyoglobine est sensible à des températures supérieures à 10°C.

$$[RL] = \frac{K_d + R_0 + L_0 - \sqrt{(K_d + R_0 + L_0)^2 - 4 R_0 L_0}}{2} \quad (\text{en } \mu\text{M})$$

avec [RL] qui est la concentration de partenaire lié (μM) ; R_0 et L_0 qui sont les concentrations initiales du récepteur et de ligand (μM) ; et K_d qui est la constante de dissociation ($40 \mu\text{M}$).

Pour nos expériences sur le peptide $\text{H3}_{122-135}$, la concentration théorique [RL] est fixée à $113 \mu\text{M}$ soit environ 80 % de peptides $\text{H3}_{122-135}$ liés, avec $R_0 = 140 \mu\text{M}$ (H3), $L_0 = 280 \mu\text{M}$ (Asf1) et $K_d = 40 \mu\text{M}$.

Pour les expériences sur la protéine hAsf1_{1-156} , la concentration théorique [RL] est fixée à $170 \mu\text{M}$ soit environ 85 % de protéines hAsf1_{1-156} liées, avec $R_0 = 200 \mu\text{M}$ (Asf1), $L_0 = 400 \mu\text{M}$ (H3) et $K_d = 40 \mu\text{M}$.

b. Protocole de mise au point (nombre de HO^\bullet et équivalent en $^3\text{H-BPASS}$)

- Effets du nombre d'impulsions sur l'incorporation de tritium**

Une solution est réalisée en ajoutant $850 \mu\text{L}$ de tampon phosphate 10 mM $\text{pH } 7,9$ et $100 \mu\text{L}$ de solution de $^3\text{H-BPASS}$ ($140 \mu\text{M}$ finale) et la solution résultante est dégazée en bullant avec N_2O pendant 30 min. L'aiguille est retirée de la solution, et sous un flux de N_2O , $50 \mu\text{L}$ de solution de $\text{H3}_{122-135}$ ($140 \mu\text{M}$ finale) sont ajoutées. Le mélange réactionnel est irradié à température ambiante avec le LINAC avec 25, 50, 100 ou 250 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz, soit respectivement une concentration de 291 (2,1 éq.), 582 (4,2 éq.), 1165 (8,3 éq.) et 2912 μM (21,0 éq.) cumulée en HO^\bullet . Les échantillons sont purifiés sur SepPack light C18 et subissent un traitement acide selon le même protocole décrit précédemment, puis purifiés par HPLC sur phase inverse C18, puis séquencés selon le protocole des parties IV.J.1.c et IV.H.

Ce protocole correspond à la Figure III-16.

- Effet du nombre d'équivalents en $^3\text{H-BPASS}$ et de la présence de hAsf1_{1-156}**

Dans la glace, une solution est réalisée en ajoutant 350 ou $50 \mu\text{L}$ de tampon phosphate 10 mM $\text{pH } 7,9$ et 100 ou $400 \mu\text{L}$ de solution de $^3\text{H-BPASS}$ ($140 \mu\text{M}$ ou $560 \mu\text{M}$ final respectivement). $50 \mu\text{L}$ de solution de $\text{H3}_{122-135}$ ($140 \mu\text{M}$ finale) et $500 \mu\text{L}$ de hAsf1_{1-156} ($280 \mu\text{M}$ finale) sont ensuite ajoutés. La solution résultante est dégazée avec N_2O pendant 5 min

sans buller. Le flux est coupé, et la solution est agitée doucement puis laissée à équilibrer en échangeant l'O₂ dissous avec les molécules de N₂O pendant 10 min. Le flux de N₂O est rallumé pendant 2 min, puis recoupé. La solution est agitée doucement puis laissée équilibrer de nouveau pendant 10 min. Cette opération est réalisée 4 fois au total. Le mélange réactionnel est irradié à 4°C avec le LINAC avec 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz, soit une concentration cumulée de 1165 µM en HO•.

L'échantillon est ensuite traité sur une colonne SepPack light tC2 (Waters) pour séparer le peptide de la protéine et pour éliminer ³H-BPASS. Après 5 lavages à l'eau, 500 µL d'un éluant à 20 %, puis 30 %, puis 70 % en ACN / TFA 0,1 % sont passés. Les fractions (20 et 30 % ACN / TFA 0,1 %) contenant le peptide sont regroupées, traitées à l'acide, et le peptide est purifié en HPLC sur phase inverse C18, puis séquencé (voir protocole dans les parties IV.H et IV.J.1.c).

Ce protocole correspond à la Figure III-17.

c. Protocole d'incorporation en atomes de tritium du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅

Dans la glace, une solution est réalisée en ajoutant 350 µL de tampon phosphate 10 mM pH 7,9, 100 µL de solution d'³H-BPASS (140 µM final) et 50 µL de solution de H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 µM final), avec ou sans ajout de 500 µL d'hAsf1₁₋₁₅₆ ou d'apomyoglobine (280 µM final). La solution résultante est dégazée avec N₂O pendant 5 min sans buller. Le flux est coupé, et la solution est agitée doucement puis laissée à équilibrer en échangeant l'O₂ dissous avec les molécules de N₂O pendant 10 min. Le flux de N₂O est rallumé pendant 2 min, puis recoupé. La solution est agitée doucement puis laissée à équilibrer de nouveau pendant 10 min. Cette opération est réalisée 4 fois au total. Le mélange réactionnel est irradié à 4°C avec le LINAC avec 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz, soit une concentration de 1165 µM cumulée en HO•.

Le peptide seul est traité sur SepPack light C18 et traité à l'acide comme précédemment.

Les échantillons contenant la protéine sont traités sur une colonne SepPack light tC2 (Waters) pour séparer le peptide de la protéine et pour éliminer ³H-BPASS. Après 5 lavages à l'eau, 500 µL d'un éluant à 20 %, puis 30 %, puis 70 % en ACN / TFA 0,1 % sont passés. H3₁₂₂₋₁₃₅ issu des échantillons contenant l'apomyoglobine, mal séparé sur SepPack light tC2, est purifié avant traitement acide par HPLC sur une colonne semi-préparative (Agilent C18 5

μ , 300 Å, 450 mm*10 mm) en isocratique H₂O/ACN/TFA 90/10/0,1 pendant 20 min ($t_{R\ H3}$ = 12 min). Les fractions (20 et 30 % ACN / TFA 0,1 %) contenant le peptide sont regroupées, traitées à l'acide, lyophilisées et reprises dans 100 μ L d'eau ultrapure.

- **Purification de H3₁₂₂₋₁₃₅ irradié avec le LINAC**

Le peptide est purifié par HPLC avec une colonne analytique (Agilent Zorbax C18, 300 Å, 250*4.6 mm) selon le gradient 2 à 20 % B en 40 min à 1 mL.min⁻¹ ($t_{R\ H3}$ = 23 min) avec les éluants (A : H₂O / FA 0,1 % ; B : ACN / FA 0,1 %), avec une détection UV à 216 nm. Les puretés UV et radiochimique sont contrôlées selon le même gradient.

Le peptide purifié est contrôlé par HPLC puis séquencé selon le protocole général (IV.H).

IV.J.2 Protocole de marquage de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆

- **Expériences d'incorporation de tritium**

Les mêmes types de solution mère que lors des expériences sur le peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ sont utilisés, à l'exception de ³H-BPASS (2 mM et 1072 MBq.mL⁻¹ ; AS = 536 GBq.mmol⁻¹) ou (2 mM et 1258 MBq.mL⁻¹ ; AS = 629 GBq.mmol⁻¹).

Dans la glace, une solution est réalisée en ajoutant 100 μ L de solution de ³H-BPASS (200 μ M final), 400 μ L ou 640 μ L de tampon phosphate pH 7,9 10 mM, respectivement avec ou sans ajout de 140 μ L de solution de H3₁₂₂₋₁₃₅ (400 μ M finale), puis 360 μ L d'hAsf1₁₋₁₅₆ (200 μ M finale). La solution résultante est dégazée avec N₂O pendant 5 min sans buller. Le flux est coupé, et la solution est agitée doucement puis laissée à équilibrer en échangeant l'O₂ dissous avec les molécules de N₂O pendant 10 min. Le flux de N₂O est rallumé pendant 2 min, puis recoupé. La solution est agitée doucement puis laissée à équilibrer de nouveau pendant 10 min. Cette opération est réalisée 4 fois au total. Le mélange réactionnel est irradié à 4°C avec le LINAC avec 50 impulsions (avec ³H-BPASS d'AS 536 GBq.mmol⁻¹) ou 200 impulsions (avec ³H-BPASS d'AS= 629 GBq.mmol⁻¹) de 20 Gy à 0,4 Hz, soit respectivement une concentration de 582 μ M ou 2330 μ M cumulée en HO[•].

- **Purification sur colonne échangeuse d'ions**

La protéine irradiée est purifiée directement sur une colonne semi-préparative échangeuse d'anions Resource Q 1 mL (Amersham) selon le gradient : 0 % B en 10 min, 0 à 20 % B en 22 min et 20 à 50 % en 50 min à 1 mL.min⁻¹ ($t_{R\ Asf} = 25$ min) avec les éluants (A : Tampon Tris 50 mM pH 8 ; B : Tampon Tris 50 mM pH 8 / NaCl 1M), avec une détection UV à 216 et 280 nm. Les puretés UV et radiochimique sont contrôlées selon le même gradient.

- **Digestion de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆ et purification sur phase inverse C18**

La protéine dans l'éluât de 2 mL est digérée avec la trypsine 1/50 (v/v) au bain-marie à 37°C pendant 10 h. Les peptides sont ensuite séparés par HPLC sur une colonne analytique (Agilent Zorbax C18, 300 Å, 250*4.6 mm) selon le gradient 2 à 50 % B en 45 min à 1 mL.min⁻¹ avec les éluants (A : H₂O / FA 0,1 % ; B : ACN / FA 0,1 %), avec une détection UV à 216 et 280 nm. Les puretés UV et radiochimique de chaque peptide sont contrôlées selon le même gradient. Les peptides sont identifiés par LC-MS. Les temps de rétention de chacun des peptides obtenus sont : 124-134 (15,0 min), 138-145, (16,0 min) 109-123 et 109-134 (21,6 min), 149-156 (22,9 min), 42-69 (31,2 min), 70-102 et 70-108 (36,2 min) et 4-41 (41,8 min).

Les peptides sélectionnés sont séquencés selon le protocole général (IV.H)

- **Normalisation**

Afin de comparer nos résultats, les activités spécifiques des résidus de hAsf11-156 sont normalisées selon trois facteurs correspondant au rapport entre l'activité spécifique d'un résidu donné respectivement en absence et en présence de H3₁₂₂₋₁₃₅.

La valeur moyenne est calculée à partir des acides aminés les mieux marqués (> à 200 Bq.nmol⁻¹) et ne présentant aucune variation d'accessibilité, soit : E₁₂₄, P₁₂₇, V₁₂₈, K₁₂₉, N₁₅₂, et E₁₅₄. Cette valeur moyenne est de 2.

Le plus grand rapport est observé pour le résidu E₁₂₄ avec de 2,9 et le plus petit avec le résidu P₁₂₇ avec 1,5 du peptide ¹²⁴-ENPPVKPDFSK-¹³⁴.

Les valeurs maximale (2,9), minimale (1,5) ou moyenne (2) sont appliquées (Figure III-22).

b. Essais de digestion de la protéine hAsf11-156 et de purification

Différents essais de digestion sont réalisés avec la trypsine (R, K en C-ter), l'endoprotéinase V8 (D et E en C-ter), la chymotrypsine (), le pepsine, la pronase (non spécifique) dans divers tampon en présence ou en absence de réduction et alkylation, de détergents et de dénaturants.

Enzyme	Quantité (m/m)	T°C	Tampon	Durée (h)	Réducteur, détergent, dénaturant.
Trypsine	1/20	37	NH ₄ HCO ₃ 50 mM pH 7,8	2 à 24	
Trypsine	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	20	
Trypsine	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	24	R/A
Trypsine	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	24	R/A Urée 3M SDS 0,1 %
Trypsine	1/20	37	Phosphate 50 mM pH 8	24	
Trypsine	1/20	37	Phosphate 50 mM pH 8 / ACN 10 %	24	
V8	1/10 à 1/50	37	Tris 50 mM pH 8	2 à 24	
V8	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	24	R/A Urée 2M
V8	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	24	R/A Urée 3M SDS 0,1 %
V8	1/10 à 1/20	37	Phosphate 10 mM pH 8	24	
V8	1/20	25	Phosphate 10 mM pH 8	24	
V8	1/20	25	NH ₄ HCO ₃ pH 7,8	24	
V8	1/20	25	NH ₄ HCO ₃ pH 7,8	24	Urée 3 M SDS 0,1 %
V8	1/20	25	NH ₄ HCO ₃ pH 7,8	24	R/A
V8	1/20	25	NH ₄ HCO ₃ pH 7,8	24	Urée 3 M SDS 0,1 % R/A
Trypsine + V8	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	24	
Trypsine puis V8	1/20	37	Tris 50 mM pH 8	10 + 24	
Chymotrypsine	1/50	37	Phosphate 10 mM pH 7,8	1, 2, 8	
Chymotrypsine	1/20	25	Tris 50 mM pH 8	18, 24	
Pronase	1/100	37	Tris 50 mM pH 8	2	
pepsine	1/20 à 1/50	37	pH 3 (HCl)	1 et 24	

Tableau IV-6 Conditions de digestion avec différentes enzymes. R : réduction, A : alkylation

L'ensemble de ces digestions est ensuite analysé par HPLC et/ou par LC-MS.

En HPLC, les colonnes en phase inverse suivantes sont testées :

- Agilent Zorbax C18, 300 Å, 5 µ, 250 mm * 4,6 mm
- Agilent Zorbax C8, 300 Å, 5 µ, 250 mm * 4,6 mm
- Luna C18, 100 Å, 5 µ, 250 mm * 4,6 mm
- Waters Atlantis dC18, 100 Å, 5 µ, 250 mm * 4,6 mm

Différents systèmes d'élution sont utilisés à TA ou à 42°C, à un débit de 1 mL.min⁻¹:

- A: H₂O/FA 0,1 %, B: ACN/FA 0,1 %
- A: H₂O/TFA 0,1 %, B: ACN/TFA 0,1 %
- A: Tp acetate d'ammonium pH 6, B: ACN

Certains échantillons ont aussi été analysés en LC-MS-MS ou par séquençage automatique d'Edman. La colonne HPLC utilisée en LC-MS est une colonne analytique Waters Atlantis dC18 (100 Å, 5 µ, 150 mm * 4,6 mm), avec les éluants A: H₂O/FA 0,1 %, B: ACN/FA 0,1 % à 800 µL.min⁻¹.

Aucune des conditions testées de digestions et de purification en phase inverse n'a permis de détecter le peptide contenant V₉₂, V₉₄ et V₉₆, les trois acides aminés les plus impliqués dans l'interaction avec H3₁₂₂₋₁₃₅, à l'exception du peptide 70-102 obtenu lors de la digestion avec la trypsine. Cependant, ce peptide est trop long et est récupéré en trop faible quantité pour pouvoir l'utiliser pour analyser les résidus d'intérêt.

La synthèse du peptide AVGVTVVLITCTYRGQE contenant V₉₄ et correspondant à un peptide théorique de la double digestion trypsine / V8 a été commandé. Ce peptide est uniquement soluble dans 100 % DMSO et peu soluble dans des systèmes H₂O/ACN. Les analyses HPLC et LC-MS menées ont montré que ce peptide est très hydrophobe et reste accroché sur la colonne. Le peptide sort sur une durée de 20 min. Les tentatives de digestions et de purifications n'ont pas été menées plus loin en raison de problème de temps.

Bibliographie

1. Fu, H., *Protein-protein interactions*. Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004. **261**.
2. Phizicky, E.M. and S. Fields, *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 94-123.
3. Hall, R.A., *Studying protein-protein interactions via blot overlay or Far Western blot*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 167-74.
4. Park, S.H. and R.T. Raines, *Green fluorescent protein chimeras to probe protein-protein interactions*. Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 251-61.
5. Bauer, A. and B. Kuster, *Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes*. Eur J Biochem, 2003. **270**(4): p. 570-8.
6. Ho, Y., et al., *Systematic identification of protein complexes in Saccharomyces cerevisiae by mass spectrometry*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 180-3.
7. Krogan, N.J., et al., *Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 637-43.
8. Li, S., et al., *A map of the interactome network of the metazoan C. elegans*. Science, 2004. **303**(5657): p. 540-3.
9. Lim, J., et al., *A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration*. Cell, 2006. **125**(4): p. 801-14.
10. Miller, J.P., et al., *Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(34): p. 12123-8.
11. Nyfeler, B., S.W. Michnick, and H.P. Hauri, *Capturing protein interactions in the secretory pathway of living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(18): p. 6350-5.
12. Uetz, P., et al., *Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome*. Science, 2006. **311**(5758): p. 239-42.
13. Collins, S.R., et al., *Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map*. Nature, 2007.
14. Ooi, S.L., et al., *Global synthetic-lethality analysis and yeast functional profiling*. Trends Genet, 2006. **22**(1): p. 56-63.
15. Pan, X., et al., *A DNA integrity network in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Cell, 2006. **124**(5): p. 1069-81.
16. Tong, A.H., et al., *Global mapping of the yeast genetic interaction network*. Science, 2004. **303**(5659): p. 808-13.
17. Lu, L., et al., *Multimeric threading-based prediction of protein-protein interactions on a genomic scale: application to the Saccharomyces cerevisiae proteome*. Genome Res, 2003. **13**(6A): p. 1146-54.
18. Obenauer, J.C. and M.B. Yaffe, *Computational prediction of protein-protein interactions*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 445-68.
19. Prinz, A., M. Diskar, and F.W. Herberg, *Application of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for biomolecular interaction studies*. Chembiochem, 2006. **7**(7): p. 1007-12.
20. Wallrabe, H. and A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(1): p. 19-27.
21. Welsh, D.K. and S.A. Kay, *Bioluminescence imaging in living organisms*. Curr Opin Biotechnol, 2005. **16**(1): p. 73-8.
22. Yan, Y. and G. Marriott, *Analysis of protein interactions using fluorescence technologies*. Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(5): p. 635-40.
23. Greenfield, N.J., *Circular dichroism analysis for protein-protein interactions*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 55-78.
24. Leavitt, S. and E. Freire, *Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry*. Curr Opin Struct Biol, 2001. **11**(5): p. 560-6.

25. Yu, X., D. Xu, and Q. Cheng, *Label-free detection methods for protein microarrays*. Proteomics, 2006. **6**(20): p. 5493-503.
26. Heyduk, T., et al., *Fluorescence anisotropy: rapid, quantitative assay for protein-DNA and protein-protein interaction*. Methods Enzymol, 1996. **274**: p. 492-503.
27. Tseng, W.L., et al., *Immunoaffinity capillary electrophoresis: determination of binding constant and stoichiometry for antibody-antigen interaction*. Electrophoresis, 2002. **23**(6): p. 836-46.
28. Wan, Q.H. and X.C. Le, *Fluorescence polarization studies of affinity interactions in capillary electrophoresis*. Anal Chem, 1999. **71**(19): p. 4183-9.
29. Wyatt, P.J., *Light scattering and the absolute characterization of macromolecules*. Anal Chim Acta, 1993. **272**: p. 1-40.
30. Laue, T.M. and W.F. Stafford, 3rd, *Modern applications of analytical ultracentrifugation*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 1999. **28**: p. 75-100.
31. Rivas, G. and A.P. Minton, *New developments in the study of biomolecular associations via sedimentation equilibrium*. Trends Biochem Sci, 1993. **18**(8): p. 284-7.
32. Wilton, R., E.A. Myatt, and F.J. Stevens, *Analysis of protein-protein interactions by simulation of small-zone gel filtration chromatography*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 137-54.
33. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
34. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
35. Puig, O., et al., *The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification*. Methods, 2001. **24**(3): p. 218-29.
36. Rigaut, G., et al., *A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1030-2.
37. Gavin, A.C., et al., *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 631-6.
38. Gavin, A.C., et al., *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 141-7.
39. Bouwmeester, T., et al., *A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 97-105.
40. Forler, D., et al., *An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(1): p. 89-92.
41. Vasilescu, J. and D. Figeys, *Mapping protein-protein interactions by mass spectrometry*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(4): p. 394-9.
42. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
43. Dove, S.L. and A. Hochschild, *A bacterial two-hybrid system based on transcription activation*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 231-46.
44. Lee, J.W. and S.K. Lee, *Mammalian two-hybrid assay for detecting protein-protein interactions in vivo*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 327-36.
45. Fields, S., *High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril*. Febs J, 2005. **272**(21): p. 5391-9.
46. Vidal, M. and P. Legrain, *Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(4): p. 919-29.
47. Inouye, C., et al., *Mutational analysis of STE5 in the yeast Saccharomyces cerevisiae: application of a differential interaction trap assay for examining protein-protein interactions*. Genetics, 1997. **147**(2): p. 479-92.

48. Serebriiskii, I., V. Khazak, and E.A. Golemis, *A two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 17080-7.
49. Serebriiskii, I.G. and E. Kotova, *Analysis of protein-protein interactions utilizing dual bait yeast two-hybrid system*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 263-96.
50. Xu, C.W., A.R. Mendelsohn, and R. Brent, *Cells that register logical relationships among proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12473-8.
51. Vidal, M., et al., *Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10315-20.
52. Vidal, M., et al., *Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10321-6.
53. Parrish, J.R., K.D. Gulyas, and R.L. Finley, Jr., *Yeast two-hybrid contributions to interactome mapping*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(4): p. 387-93.
54. Uetz, P., et al., *A comprehensive analysis of protein-protein interactions in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 623-7.
55. Flajolet, M., et al., *A genomic approach of the hepatitis C virus generates a protein interaction map*. Gene, 2000. **242**(1-2): p. 369-79.
56. Giot, L., et al., *A protein interaction map of Drosophila melanogaster*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1727-36.
57. Ito, T., et al., *A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4569-74.
58. LaCount, D.J., et al., *A protein interaction network of the malaria parasite Plasmodium falciparum*. Nature, 2005. **438**(7064): p. 103-7.
59. Rain, J.C., et al., *The protein-protein interaction map of Helicobacter pylori*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 211-5.
60. Rual, J.F., et al., *Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network*. Nature, 2005. **437**(7062): p. 1173-8.
61. Stelzl, U., et al., *A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 957-68.
62. Fetchko, M. and I. Stagljar, *Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions*. Methods, 2004. **32**(4): p. 349-62.
63. Johnsson, N. and A. Varshavsky, *Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10340-4.
64. Stagljar, I., et al., *A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5187-92.
65. Dunnwald, M., A. Varshavsky, and N. Johnsson, *Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(2): p. 329-44.
66. Laser, H., et al., *A new screen for protein interactions reveals that the Saccharomyces cerevisiae high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the GAL1 promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13732-7.
67. Wittke, S., et al., *Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(8): p. 2519-30.
68. Obrdlik, P., et al., *K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12242-7.

69. Remy, I. and S.W. Michnick, *Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(10): p. 5394-9.
70. Rossi, F., C.A. Charlton, and H.M. Blau, *Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(16): p. 8405-10.
71. Galarneau, A., et al., *Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 619-22.
72. Wehrman, T., et al., *Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta -lactamase enzyme fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3469-74.
73. Luker, K.E., et al., *Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(33): p. 12288-93.
74. Paulmurugan, R. and S.S. Gambhir, *Monitoring protein-protein interactions using split synthetic renilla luciferase protein-fragment-assisted complementation*. Anal Chem, 2003. **75**(7): p. 1584-9.
75. Pelletier, J.N., et al., *An in vivo library-versus-library selection of optimized protein-protein interactions*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(7): p. 683-90.
76. Ghosh, I., A.D. Hamilton, and L. Regan, *Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the Green Fluorescent Protein*. J Am Chem Soc, 2000. **122**: p. 5658-5659.
77. Magliery, T.J., et al., *Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(1): p. 146-57.
78. Hu, C.D. and T.K. Kerppola, *Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(5): p. 539-45.
79. Remy, I. and S.W. Michnick, *Regulation of apoptosis by the Ft1 protein, a new modulator of protein kinase B/Akt*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(4): p. 1493-504.
80. Remy, I., A. Montmarquette, and S.W. Michnick, *PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(4): p. 358-65.
81. Kanno, A., T. Ozawa, and Y. Umezawa, *Intein-mediated reporter gene assay for detecting protein-protein interactions in living mammalian cells*. Anal Chem, 2006. **78**(2): p. 556-60.
82. Ozawa, T., et al., *Split luciferase as an optical probe for detecting protein-protein interactions in mammalian cells based on protein splicing*. Anal Chem, 2001. **73**(11): p. 2516-21.
83. Ozawa, T., et al., *A fluorescent indicator for detecting protein-protein interactions in vivo based on protein splicing*. Anal Chem, 2000. **72**(21): p. 5151-7.
84. Kehoe, J.W. and B.K. Kay, *Filamentous phage display in the new millennium*. Chem Rev, 2005. **105**(11): p. 4056-72.
85. Sidhu, S.S., W.J. Fairbrother, and K. Deshayes, *Exploring protein-protein interactions with phage display*. Chembiochem, 2003. **4**(1): p. 14-25.
86. Sondermann, H., C. Zhao, and D. Bar-Sagi, *Analysis of Ras:RasGEF interactions by phage display and static multi-angle light scattering*. Methods, 2005. **37**(2): p. 197-202.

87. Sidhu, S.S., et al., *Phage display for selection of novel binding peptides*. Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 333-63.
88. Landgraf, C., et al., *Protein interaction networks by proteome peptide scanning*. PLoS Biol, 2004. **2**(1): p. E14.
89. Tong, A.H., et al., *A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules*. Science, 2002. **295**(5553): p. 321-4.
90. Cramer, R. and R. Kodzius, *The powerful combination of phage surface display of cDNA libraries and high throughput screening*. Comb Chem High Throughput Screen, 2001. **4**(2): p. 145-55.
91. Hertveldt, K., et al., *Identification of Gal80p-interacting proteins by Saccharomyces cerevisiae whole genome phage display*. Gene, 2003. **307**: p. 141-9.
92. Ansuini, H., et al., *Biotin-tagged cDNA expression libraries displayed on lambda phage: a new tool for the selection of natural protein ligands*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(15): p. e78.
93. Gupta, A., et al., *High-density functional display of proteins on bacteriophage lambda*. J Mol Biol, 2003. **334**(2): p. 241-54.
94. Khare, P.D., S.J. Russell, and M.J. Federspiel, *Avian leukosis virus is a versatile eukaryotic platform for polypeptide display*. Virology, 2003. **315**(2): p. 303-12.
95. Urban, J.H., et al., *Selection of functional human antibodies from retroviral display libraries*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(4): p. e35.
96. Georgiou, G., et al., *Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(1): p. 29-34.
97. Wang, Y., et al., *Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2476-81.
98. Hanes, J., L. Jermutus, and A. Pluckthun, *Selecting and evolving functional proteins in vitro by ribosome display*. Methods Enzymol, 2000. **328**: p. 404-30.
99. Nemoto, N., et al., *In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro*. FEBS Lett, 1997. **414**(2): p. 405-8.
100. Roberts, R.W. and J.W. Szostak, *RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(23): p. 12297-302.
101. Yonezawa, M., et al., *DNA display for in vitro selection of diverse peptide libraries*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(19): p. e118.
102. Takahashi, T.T., R.J. Austin, and R.W. Roberts, *mRNA display: ligand discovery, interaction analysis and beyond*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(3): p. 159-65.
103. Horisawa, K., et al., *In vitro selection of Jun-associated proteins using mRNA display*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(21): p. e169.
104. Sawata, S.Y., E. Suyama, and K. Taira, *A system based on specific protein-RNA interactions for analysis of target protein-protein interactions in vitro: successful selection of membrane-bound Bak-Bcl-xL proteins in vitro*. Protein Eng Des Sel, 2004. **17**(6): p. 501-8.
105. Thom, G., et al., *Probing a protein-protein interaction by in vitro evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7619-24.
106. Bertone, P. and M. Snyder, *Advances in functional protein microarray technology*. Febs J, 2005. **272**(21): p. 5400-11.
107. MacBeath, G. and S.L. Schreiber, *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1760-3.

108. Ramachandran, N., et al., *Self-assembling protein microarrays*. Science, 2004. **305**(5680): p. 86-90.
109. Reineke, U., R. Volkmer-Engert, and J. Schneider-Mergener, *Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology*. Curr Opin Biotechnol, 2001. **12**(1): p. 59-64.
110. Ramachandran, N., et al., *Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays*. Febs J, 2005. **272**(21): p. 5412-25.
111. Zhu, H., et al., *Global analysis of protein activities using proteome chips*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2101-5.
112. Jones, R.B., et al., *A quantitative protein interaction network for the ErbB receptors using protein microarrays*. Nature, 2006. **439**(7073): p. 168-74.
113. Stiffler, M.A., et al., *Uncovering quantitative protein interaction networks for mouse PDZ domains using protein microarrays*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(17): p. 5913-22.
114. Kanda, V., et al., *Label-free reading of microarray-based immunoassays with surface plasmon resonance imaging*. Anal Chem, 2004. **76**(24): p. 7257-62.
115. Yuk, J.S., et al., *Analysis of protein interactions on protein arrays by a wavelength interrogation-based surface plasmon resonance biosensor*. Proteomics, 2004. **4**(11): p. 3468-76.
116. Natsume, T., H. Nakayama, and T. Isobe, *BIA-MS-MS: biomolecular interaction analysis for functional proteomics*. Trends Biotechnol, 2001. **19**(10 Suppl): p. S28-33.
117. Yu, X., et al., *An impedance array biosensor for detection of multiple antibody-antigen interactions*. Analyst, 2006. **131**(6): p. 745-50.
118. Yang, Y., H. Wang, and D.A. Erie, *Quantitative characterization of biomolecular assemblies and interactions using atomic force microscopy*. Methods, 2003. **29**(2): p. 175-87.
119. Hinterdorfer, P. and Y.F. Dufrene, *Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy*. Nat Methods, 2006. **3**(5): p. 347-55.
120. Llorca, O., *Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(10): p. 1153-64.
121. Rodal, A.A., et al., *Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(1): p. 26-31.
122. Rossmann, M.G., et al., *Combining X-ray crystallography and electron microscopy*. Structure, 2005. **13**(3): p. 355-62.
123. Chiu, W., et al., *Electron cryomicroscopy of biological machines at subnanometer resolution*. Structure, 2005. **13**(3): p. 363-72.
124. Orlova, E.V. and H.R. Saibil, *Structure determination of macromolecular assemblies by single-particle analysis of cryo-electron micrographs*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(5): p. 584-90.
125. Svergun, D.I. and M.H.J. Koch, *Small-angle scattering studies of biological macromolecules in solution*. Rep Prog Phys, 2003. **66**: p. 1735-1782.
126. Pioletti, M., et al., *Three-dimensional structure of the KChIP1-Kv4.3 T1 complex reveals a cross-shaped octamer*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(11): p. 987-95.
127. Krueger, J.K., et al., *Neutron-scattering studies reveal further details of the Ca²⁺/calmodulin-dependent activation mechanism of myosin light chain kinase*. Biochemistry, 1998. **37**(40): p. 13997-4004.
128. Wery, J.P. and R.W. Schevitz, *New trends in macromolecular X-ray crystallography*. Curr Opin Chem Biol, 1997. **1**(3): p. 365-9.
129. Bergfors, T.M., *Protein Crystallization, Techniques, Strategies and Tips A laboratory Manual*. International University Line, La Jolla, 1999.

130. McPherson, A., *Crystallization of biological macromolecules* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999.
131. Delucas, L.J., et al., *Protein crystallization: virtual screening and optimization*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **88**(3): p. 285-309.
132. Pusey, M.L., et al., *Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography*. Prog Biophys Mol Biol, 2005. **88**(3): p. 359-86.
133. Taylor, G., *The phase problem*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 11): p. 1881-90.
134. English, C.M., et al., *Structural basis for the histone chaperone activity of Asf1*. Cell, 2006. **127**(3): p. 495-508.
135. Matsuura, Y. and M. Stewart, *Structural basis for the assembly of a nuclear export complex*. Nature, 2004. **432**(7019): p. 872-7.
136. Vaynberg, J. and J. Qin, *Weak protein-protein interactions as probed by NMR spectroscopy*. Trends Biotechnol, 2006. **24**(1): p. 22-7.
137. Fernandez, C. and G. Wider, *TROSY in NMR studies of the structure and function of large biological macromolecules*. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(5): p. 570-80.
138. Horst, R., et al., *Direct NMR observation of a substrate protein bound to the chaperonin GroEL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(36): p. 12748-53.
139. Takeuchi, K. and G. Wagner, *NMR studies of protein interactions*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(1): p. 109-17.
140. Zuiderweg, E.R., *Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy*. Biochemistry, 2002. **41**(1): p. 1-7.
141. Takahashi, H., et al., *A novel NMR method for determining the interfaces of large protein-protein complexes*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(3): p. 220-3.
142. Arumugam, S. and S.R. Van Doren, *Global orientation of bound MMP-3 and N-TIMP-1 in solution via residual dipolar couplings*. Biochemistry, 2003. **42**(26): p. 7950-8.
143. Fushman, D., et al., *Determining domain orientation in macromolecules by using spin-relaxation and residual dipolar coupling measurements*. Prog Nucl Mag Res Sp, 2004. **44**: p. 189-214.
144. Crane, J.M., et al., *Mapping of the docking of SecA onto the chaperone SecB by site-directed spin labeling: insight into the mechanism of ligand transfer during protein export*. J Mol Biol, 2005. **353**(2): p. 295-307.
145. Fanucci, G.E. and D.S. Cafiso, *Recent advances and applications of site-directed spin labeling*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(5): p. 644-53.
146. Hubbell, W.L., et al., *Recent advances in site-directed spin labeling of proteins*. Curr Opin Struct Biol, 1998. **8**(5): p. 649-56.
147. Hanson, S.M., et al., *Differential interaction of spin-labeled arrestin with inactive and active phosphorhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4900-5.
148. Polverini, E., et al., *Electron paramagnetic resonance spectroscopy and molecular modelling of the interaction of myelin basic protein (MBP) with calmodulin (CaM)-diversity and conformational adaptability of MBP CaM-targets*. J Struct Biol, 2004. **148**(3): p. 353-69.
149. Mansoor, S.E. and D.L. Farrens, *High-throughput protein structural analysis using site-directed fluorescence labeling and the bimane derivative (2-pyridyl)dithiobimane*. Biochemistry, 2004. **43**(29): p. 9426-38.
150. Mansoor, S.E., H.S. McHaourab, and D.L. Farrens, *Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence*. Biochemistry, 2002. **41**(8): p. 2475-84.

151. Korman, V.L., et al., *Structural dynamics of the actin-myosin interface by site-directed spectroscopy*. J Mol Biol, 2006. **356**(5): p. 1107-17.
152. Sosa-Peinado, A. and M. Gonzalez-Andrade, *Site-directed fluorescence labeling reveals differences on the R-conformer of glucosamine 6-phosphate deaminase of Escherichia coli induced by active or allosteric site ligands at steady state*. Biochemistry, 2005. **44**(46): p. 15083-92.
153. Cunningham, B.C. and J.A. Wells, *High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis*. Science, 1989. **244**(4908): p. 1081-5.
154. Weiss, G.A., et al., *Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8950-4.
155. Lai, J.R., et al., *A protein interaction surface in nonribosomal peptide synthesis mapped by combinatorial mutagenesis and selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5314-9.
156. Levin, A.M., et al., *Exploring the interaction between the protein kinase A catalytic subunit and caveolin-1 scaffolding domain with shotgun scanning, oligomer complementation, NMR, and docking*. Protein Sci, 2006. **15**(3): p. 478-86.
157. Back, J.W., et al., *Chemical cross-linking and mass spectrometry for protein structural modeling*. J Mol Biol, 2003. **331**(2): p. 303-13.
158. Young, M.M., et al., *High throughput protein fold identification by using experimental constraints derived from intramolecular cross-links and mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5802-6.
159. Ermolova, N., L. Guan, and H.R. Kaback, *Intermolecular thiol cross-linking via loops in the lactose permease of Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(18): p. 10187-92.
160. Trakselis, M.A., S.C. Alley, and F.T. Ishmael, *Identification and mapping of protein-protein interactions by a combination of cross-linking, cleavage, and proteomics*. Bioconjug Chem, 2005. **16**(4): p. 741-50.
161. Chu, F., et al., *Unraveling the interface of signal recognition particle and its receptor by using chemical cross-linking and tandem mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16454-9.
162. Schulz, D.M., et al., *Mapping the topology and determination of a low-resolution three-dimensional structure of the calmodulin-melittin complex by chemical cross-linking and high-resolution FTICRMS: direct demonstration of multiple binding modes*. Biochemistry, 2004. **43**(16): p. 4703-15.
163. Sinz, A., *Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions*. Mass Spectrom Rev, 2006. **25**(4): p. 663-82.
164. Ohguro, H., et al., *Topographic study of arrestin using differential chemical modifications and hydrogen/deuterium exchange*. Protein Sci, 1994. **3**(12): p. 2428-34.
165. Ploug, M., et al., *Chemical modification of the urokinase-type plasminogen activator and its receptor using tetranitromethane. Evidence for the involvement of specific tyrosine residues in both molecules during receptor-ligand interaction*. Biochemistry, 1995. **34**(39): p. 12524-34.
166. Scaloni, A., et al., *Probing the reactivity of nucleophile residues in human 2,3-diphosphoglycerate/deoxy-hemoglobin complex by aspecific chemical modifications*. FEBS Lett, 1999. **452**(3): p. 190-4.
167. Silverman, J.A. and P.B. Harbury, *Rapid mapping of protein structure, interactions, and ligand binding by misincorporation proton-alkyl exchange*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 30968-75.

168. Gomez, G.E., et al., *Exploring protein interfaces with a general photochemical reagent*. Protein Sci, 2006. **15**(4): p. 744-52.
169. Galas, D.J. and A. Schmitz, *DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity*. Nucleic Acids Res, 1978. **5**(9): p. 3157-70.
170. Loizos, N., *Mapping protein-ligand interactions by hydroxyl-radical protein footprinting*. Methods Mol Biol, 2004. **261**: p. 199-210.
171. Loizos, N. and S.A. Darst, *Mapping protein-ligand interactions by footprinting, a radical idea*. Structure, 1998. **6**(6): p. 691-5.
172. Scaloni, A., et al., *Topology of the calmodulin-melittin complex*. J Mol Biol, 1998. **277**(4): p. 945-58.
173. Zhong, M., L. Lin, and N.R. Kallenbach, *A method for probing the topography and interactions of proteins: footprinting of myoglobin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(6): p. 2111-5.
174. Heyduk, E. and T. Heyduk, *Mapping protein domains involved in macromolecular interactions: a novel protein footprinting approach*. Biochemistry, 1994. **33**(32): p. 9643-50.
175. Heyduk, T., et al., *Determinants of RNA polymerase alpha subunit for interaction with beta, beta', and sigma subunits: hydroxyl-radical protein footprinting*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10162-6.
176. Datwyler, S.A. and C.F. Meares, *Protein-protein interactions mapped by artificial proteases: where sigma factors bind to RNA polymerase*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(9): p. 408-14.
177. Chen, H.T. and S. Hahn, *Binding of TFIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex*. Mol Cell, 2003. **12**(2): p. 437-47.
178. Guan, J.Q. and M.R. Chance, *Structural proteomics of macromolecular assemblies using oxidative footprinting and mass spectrometry*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(10): p. 583-92.
179. Maleknia, S.D., M.R. Chance, and K.M. Downard, *Electrospray-assisted modification of proteins: a radical probe of protein structure*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999. **13**(23): p. 2352-8.
180. Maleknia, S.D., et al., *Determination of macromolecular folding and structure by synchrotron x-ray radiolysis techniques*. Anal Biochem, 2001. **289**(2): p. 103-15.
181. Sharp, J.S., J.M. Becker, and R.L. Hettich, *Protein surface mapping by chemical oxidation: structural analysis by mass spectrometry*. Anal Biochem, 2003. **313**(2): p. 216-25.
182. Sharp, J.S., J.M. Becker, and R.L. Hettich, *Analysis of protein solvent accessible surfaces by photochemical oxidation and mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(3): p. 672-83.
183. Wong, J.W., S.D. Maleknia, and K.M. Downard, *Hydroxyl radical probe of the calmodulin-melittin complex interface by electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(2): p. 225-33.
184. Xu, G. and M.R. Chance, *Radiolytic modification and reactivity of amino acid residues serving as structural probes for protein footprinting*. Anal Chem, 2005. **77**(14): p. 4549-55.
185. Lim, J. and R.W. Vachet, *Development of a methodology based on metal-catalyzed oxidation reactions and mass spectrometry to determine the metal binding sites in copper metalloproteins*. Anal Chem, 2003. **75**(5): p. 1164-72.
186. Komives, E.A., *Protein-protein interaction dynamics by amide H/2H exchange mass spectrometry*. Int J Mass Spectrom, 2005. **240**: p. 285-290.

187. Zhou, B., et al., *Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38834-44.
188. Anand, G.S., et al., *Identification of the protein kinase A regulatory R1alpha-catalytic subunit interface by amide H/2H exchange and protein docking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13264-9.
189. Horn, J.R., et al., *The role of protein dynamics in increasing binding affinity for an engineered protein-protein interaction established by H/D exchange mass spectrometry*. Biochemistry, 2006. **45**(28): p. 8488-98.
190. van Dijk, A.D., R. Boelens, and A.M. Bonvin, *Data-driven docking for the study of biomolecular complexes*. Febs J, 2005. **272**(2): p. 293-312.
191. Halperin, I., et al., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins, 2002. **47**(4): p. 409-43.
192. Bonvin, A.M., *Flexible protein-protein docking*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 194-200.
193. Gray, J.J., *High-resolution protein-protein docking*. Curr Opin Struct Biol, 2006. **16**(2): p. 183-93.
194. Mendez, R., et al., *Assessment of CAPRI predictions in rounds 3-5 shows progress in docking procedures*. Proteins, 2005. **60**(2): p. 150-69.
195. Barnham, K.J., C.L. Masters, and A.I. Bush, *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(3): p. 205-14.
196. Davies, M.J. and R.T. Dean, *Radical-mediated protein oxidation : from chemistry to medicine*. Oxford University Press : Oxford, 1997.
197. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 109-42.
198. Suzuki, Y.J., H.J. Forman, and A. Sevanian, *Oxidants as stimulators of signal transduction*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(1-2): p. 269-85.
199. Gomes, A., E. Fernandes, and J.L. Lima, *Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*. J Biochem Biophys Methods, 2005. **65**(2-3): p. 45-80.
200. Davies, M.J. and C.L. Hawkins, *EPR spin trapping of protein radicals*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(9): p. 1072-86.
201. Jeschke, G., *EPR techniques for studying radical enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1707**(1): p. 91-102.
202. Wright, P.J. and A.M. English, *Scavenging with TEMPO* to identify peptide- and protein-based radicals by mass spectrometry: advantages of spin scavenging over spin trapping*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(28): p. 8655-65.
203. Filosa, A. and A.M. English, *Mass spectral analysis of protein-based radicals using DBNBS. Nonradical adduct formation versus spin trapping*. J Biol Chem, 2001. **276**(24): p. 21022-7.
204. Goshe, M.B. and V.E. Anderson, *Hydroxyl radical-induced hydrogen/deuterium exchange in amino acid carbon-hydrogen bonds*. Radiat Res, 1999. **151**(1): p. 50-8.
205. Goshe, M.B., Y.H. Chen, and V.E. Anderson, *Identification of the sites of hydroxyl radical reaction with peptides by hydrogen/deuterium exchange: prevalence of reactions with the side chains*. Biochemistry, 2000. **39**(7): p. 1761-70.
206. Nukuna, B.N., M.B. Goshe, and V.E. Anderson, *Sites of hydroxyl radical reaction with amino acids identified by (2)H NMR detection of induced (1)H/(2)H exchange*. J Am Chem Soc, 2001. **123**(6): p. 1208-14.
207. Holt, L.A. and B. Milligan, *The labelling of proteins by irradiation in tritiated water*. Biochim Biophys Acta, 1972. **264**(3): p. 432-9.

208. Baratova, L.A., et al., [*Study of three-dimensional structure of proteins by means of tritium labeling. I. Free amino acids as a model of residues in an unfolded polypeptide chain*]. Mol Biol (Mosk), 1982. **16**(1): p. 117-22.
209. Gol'danskii, V.I., et al., [*Study of the three-dimensional structure of proteins by means of tritium labeling. II. Intramolecular distribution of tritium in the N-terminal part of myoglobin and the tertiary structure of protein*]. Mol Biol (Mosk), 1982. **16**(3): p. 528-34.
210. Shishkov, A.V. and L.A. Baratova, *Tritium planigraphy of biological systems*. Russ Chem Rev, 1994. **63**(9): p. 781-796.
211. Baratova, L.A., et al., *In situ spatial organization of Potato virus A coat protein subunits as assessed by tritium bombardment*. J Virol, 2001. **75**(20): p. 9696-702.
212. Shishkov, A.V., et al., *The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7827-30.
213. Shishkov, A.V., et al., *Studying the spatial organization of membrane proteins by means of tritium stratigraphy: bacteriorhodopsin in purple membrane*. Bioelectrochemistry, 2002. **56**(1-2): p. 147-9.
214. Yusupov, M.M. and A.S. Spirin, *Hot tritium bombardment technique for ribosome surface topography*. Methods Enzymol, 1988. **164**: p. 426-39.
215. Buxton, G.V., et al., *Critical review of rate constant for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in aqueous solution*. J Phys chem Ref Data, 1988. **17**(2): p. 512-781.
216. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *Generation and propagation of radical reactions on proteins*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1504**(2-3): p. 196-219.
217. Bohn, B., *Formation of peroxy radicals from OH-toluene adducts and O₂*. J Phys Chem A, 2001. **105**: p. 6092-6101.
218. Gonzalez, M.G., et al., J Photochem Photobiol C-Photochem Rev, 2004. **5**: p. 225-246.
219. Stolz, T., et al., *Self radiolysis of tritiated water*. Fusion Engineering and Design, 2003. **69**: p. 57-60.
220. Studer, A. and S. Amrein, *Tin hydride substitutes in reductive radical chain reactions*. Synthesis, 2002. **7**: p. 835-849.
221. Drozdova, T.I. and D.E. T., *Reactivity of the Ge-H, Sn-H, P-H, and Se-H bonds in radical abstraction reactions*. Kinet Catal, 2002. **43**(1): p. 10-18.
222. Barton, D.H.R., D.O. Jang, and J.C. Jaszberenyi, *The invention of radical reactions. 32. Radical deoxygenations, dahalogenations, and deaminations with dialkyl phosphites and hypophosphorous acid as hydrogen sources*. J Org Chem, 1993. **58**: p. 6838-6842.
223. Leca, D., et al., *Recent advances in the use of phosphorus-centered radicals in organic chemistry*. Chem Soc Rev, 2005. **34**(10): p. 858-65.
224. Maurus, R., et al., *A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1341**(1): p. 1-13.
225. Dizdaroglu, M. and M.G. Simic, *Isolation and characterization of radiation-induced aliphatic peptide dimers*. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, 1983. **44**(3): p. 231-9.
226. Easton, C.J., *Free-Radical Reactions in the Synthesis of alpha-Amino Acids and Derivatives*. Chem Rev, 1997. **97**(1): p. 53-82.
227. Garisson, W.M., *Radiation chemistry of organo-nitrogen compounds*. Current Topics in Radiation Research. Ebert, Michael ; Howard, Alma (eds.). New York, John Wiley and Sons, Inc., , 1968. **Vol. IV**: p. 43-94.

228. Hawkins, C.L. and M.J. Davies, *EPR studies on the selectivity of hydroxyl radical attack on amino acids and peptides*. J Chem Soc, Perkin Trans 2, 1998: p. 2617-2622.
229. Simic, M.G., P. Neta, and E. Hayon, *Selectivity in the reactions of hydrated electron and OH radicals with simple peptides in aqueous solution. Optical absorption spectra of intermediates*. J Am Chem Soc, 1970. **92**(6): p. 4763-4768.
230. Prutz, W.A., et al., *The role of sulphur peptide functions in free radical transfer: a pulse radiolysis study*. Int J Radiat Biol, 1989. **55**(4): p. 539-56.
231. Fu, S., et al., *Structural identification of valine hydroperoxides and hydroxides on radical-damaged amino acid, peptide, and protein molecules*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(3): p. 281-92.
232. Fu, S.L. and R.T. Dean, *Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins*. Biochem J, 1997. **324** (Pt 1): p. 41-8.
233. Gedrovich, A.V. and G.A. Badun, *[Study of the spatial structure of globular proteins by tritium planigraphy. Short peptides as a model of a fully extended polypeptide chain]*. Mol Biol (Mosk), 1992. **26**(3): p. 558-64.
234. Mossoba, M.M., I. Rosenthal, and P. Riesz, *Electron spin resonance of spin-trapped radicals of amines and polyamines. Hydroxyl radical reactions in aqueous solutions and gamma-radiolysis in the solid state*. Can J Chem, 1982. **60**(12): p. 1493-1500.
235. Schoneich, C., et al., *Free radical reactions of methionine in peptides: mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease*. J Am Chem Soc, 2003. **125**(45): p. 13700-13.
236. Xu, G., et al., *Secondary reactions and strategies to improve quantitative protein footprinting*. Anal Chem, 2005. **77**(10): p. 3029-37.
237. Armstrong, R.C. and A.J. Swallow, *Pulse- and gamma-radiolysis of aqueous solutions of tryptophan*. Radiat Res, 1969. **40**(3): p. 563-79.
238. Armstrong, W.A. and W.G. Humphreys, *Amino acid radicals produced chemically in aqueous solutions. Electron spin resonance spectra and relation to radiolysis products*. Can J Chem, 1967. **45**: p. 2589-2597.
239. Sokol, H.A., W. Bennett-Corniea, and W.M. Garrison, *A marked effect of conformation in the radiolysis of poly-alpha-L-glutamic acid in aqueous solution*. J Am Chem Soc, 1965. **87**(6): p. 1391-1392.
240. Sharp, J.S. and K.B. Tomer, *Effects of anion proximity in peptide primary sequence on the rate and mechanism of leucine oxidation*. Anal Chem, 2006. **78**(14): p. 4885-93.
241. Le, S., et al., *Two new S-phase-specific genes from Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 1997. **13**(11): p. 1029-42.
242. Mousson, F., F. Ochsenbein, and C. Mann, *The histone chaperone Asf1 at the crossroads of chromatin and DNA checkpoint pathways*. Chromosoma, 2007. **116**(2): p. 79-93.
243. Khorasanizadeh, S., *The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation*. Cell, 2004. **116**(2): p. 259-72.
244. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
245. Luger, K., *Dynamic nucleosomes*. Chromosome Res, 2006. **14**(1): p. 5-16.
246. Franco, A.A., et al., *Histone deposition protein Asf1 maintains DNA replisome integrity and interacts with replication factor C*. Genes Dev, 2005. **19**(11): p. 1365-75.
247. Tagami, H., et al., *Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis*. Cell, 2004. **116**(1): p. 51-61.
248. Green, E.M., et al., *Replication-independent histone deposition by the HIR complex and Asf1*. Curr Biol, 2005. **15**(22): p. 2044-9.

249. Sharp, J.A., G. Rizki, and P.D. Kaufman, *Regulation of histone deposition proteins Asf1/Hir1 by multiple DNA damage checkpoint kinases in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 2005. **171**(3): p. 885-99.
250. English, C.M., et al., *ASF1 binds to a heterodimer of histones H3 and H4: a two-step mechanism for the assembly of the H3-H4 heterotetramer on DNA*. Biochemistry, 2005. **44**(42): p. 13673-82.
251. Groth, A., et al., *Human Asf1 regulates the flow of S phase histones during replicational stress*. Mol Cell, 2005. **17**(2): p. 301-11.
252. Munakata, T., et al., *A human homologue of yeast anti-silencing factor has histone chaperone activity*. Genes Cells, 2000. **5**(3): p. 221-33.
253. Natsume, R., et al., *Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4*. Nature, 2007. **446**(7133): p. 338-41.
254. Adkins, M.W., S.R. Howar, and J.K. Tyler, *Chromatin disassembly mediated by the histone chaperone Asf1 is essential for transcriptional activation of the yeast PHO5 and PHO8 genes*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 657-66.
255. Adkins, M.W. and J.K. Tyler, *The histone chaperone Asf1p mediates global chromatin disassembly in vivo*. J Biol Chem, 2004. **279**(50): p. 52069-74.
256. Schwabish, M.A. and K. Struhl, *Asf1 mediates histone eviction and deposition during elongation by RNA polymerase II*. Mol Cell, 2006. **22**(3): p. 415-22.
257. Emili, A., et al., *Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 13-20.
258. Hu, F., A.A. Alcasabas, and S.J. Elledge, *Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly*. Genes Dev, 2001. **15**(9): p. 1061-6.
259. Gilbert, C.S., C.M. Green, and N.F. Lowndes, *Budding yeast Rad9 is an ATP-dependent Rad53 activating machine*. Mol Cell, 2001. **8**(1): p. 129-36.
260. Sanchez, Y., et al., *Regulation of RAD53 by the ATM-like kinases MEC1 and TEL1 in yeast cell cycle checkpoint pathways*. Science, 1996. **271**(5247): p. 357-60.
261. Driscoll, R., A. Hudson, and S.P. Jackson, *Yeast Rtt109 promotes genome stability by acetylating histone H3 on lysine 56*. Science, 2007. **315**(5812): p. 649-52.
262. Recht, J., et al., *Histone chaperone Asf1 is required for histone H3 lysine 56 acetylation, a modification associated with S phase in mitosis and meiosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(18): p. 6988-93.
263. Garcia, B.A., et al., *Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7641-55.
264. Xu, F., K. Zhang, and M. Grunstein, *Acetylation in histone H3 globular domain regulates gene expression in yeast*. Cell, 2005. **121**(3): p. 375-85.
265. Groth, A., et al., *Human Tousled like kinases are targeted by an ATM- and Chk1-dependent DNA damage checkpoint*. Embo J, 2003. **22**(7): p. 1676-87.
266. Krause, D.R., et al., *Suppression of Tousled-like kinase activity after DNA damage or replication block requires ATM, NBS1 and Chk1*. Oncogene, 2003. **22**(38): p. 5927-37.
267. Sillje, H.H. and E.A. Nigg, *Identification of human Asf1 chromatin assembly factors as substrates of Tousled-like kinases*. Curr Biol, 2001. **11**(13): p. 1068-73.
268. Singer, M.S., et al., *Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 1998. **150**(2): p. 613-32.
269. Kaufman, P.D., J.L. Cohen, and M.A. Osley, *Hir proteins are required for position-dependent gene silencing in Saccharomyces cerevisiae in the absence of chromatin assembly factor I*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(8): p. 4793-806.

270. Osada, S., et al., *The yeast SAS (something about silencing) protein complex contains a MYST-type putative acetyltransferase and functions with chromatin assembly factor ASF1*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3155-68.
271. Zhang, R., et al., *Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA*. Dev Cell, 2005. **8**(1): p. 19-30.
272. Spector, M.S., et al., *Hir1p and Hir2p function as transcriptional corepressors to regulate histone gene transcription in the Saccharomyces cerevisiae cell cycle*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(2): p. 545-52.
273. Sutton, A., et al., *Yeast ASF1 protein is required for cell cycle regulation of histone gene transcription*. Genetics, 2001. **158**(2): p. 587-96.
274. Hansen, J.C., C. Tse, and A.P. Wolffe, *Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye*. Biochemistry, 1998. **37**(51): p. 17637-41.
275. Stallcup, M.R., *Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3014-20.
276. de la Cruz, X., et al., *Do protein motifs read the histone code?* Bioessays, 2005. **27**(2): p. 164-75.
277. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
278. Mersfelder, E.L. and M.R. Parthun, *The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(9): p. 2653-62.
279. Peterson, C.L. and M.A. Laniel, *Histones and histone modifications*. Curr Biol, 2004. **14**(14): p. R546-51.
280. Santos-Rosa, H., et al., *Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 407-11.
281. Bryk, M., et al., *Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in S. cerevisiae by a Sir2-independent mechanism*. Curr Biol, 2002. **12**(2): p. 165-70.
282. Ozdemir, A., et al., *Histone H3 lysine 56 acetylation: a new twist in the chromosome cycle*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2602-8.
283. He, H. and N. Lehming, *Global effects of histone modifications*. Brief Funct Genomic Proteomic, 2003. **2**(3): p. 234-43.
284. Bernstein, E. and S.B. Hake, *The nucleosome: a little variation goes a long way*. Biochem Cell Biol, 2006. **84**(4): p. 505-17.
285. Daganzo, S.M., et al., *Structure and function of the conserved core of histone deposition protein Asf1*. Curr Biol, 2003. **13**(24): p. 2148-58.
286. Mousson, F., et al., *Structural basis for the interaction of Asf1 with histone H3 and its functional implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(17): p. 5975-80.
287. Agez, M., et al., *Structure of the histone chaperone ASF1 bound to the histone H3 C-terminal helix and functional insights*. Structure, 2007. **15**(2): p. 191-9.
288. Antczak, A.J., et al., *Structure of the yeast histone H3-ASF1 interaction: implications for chaperone mechanism, species-specific interactions, and epigenetics*. BMC Struct Biol, 2006. **6**: p. 26.
289. Tang, Y., et al., *Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(10): p. 921-9.
290. Rossi-Fanelli, A., E. Antonini, and A. Caputo, *Pure native globin from human hemoglobin: preparation and some physico-chemical properties*. Biochim Biophys Acta, 1958. **30**: p. 608-615.

- 291. Colonna, G., et al., *The effect of evolution on homologous proteins: a comparison between the chromophore microenvironments of Italian water buffalo (*Bos bubalus*, L.) and sperm whale apomyoglobin*. Biochim Biophys Acta, 1978. **532**(2): p. 354-67.
- 292. Fricke, H. and E.J. Hart, *In Radiation Dosimetry*. (F. H. Attix, W. C. Roesch Eds), Academic press, New York and London, 1966. **Vol. 2**: p. 167-232.
- 293. Janata, E. and R.H. Schuler, *Rate constant for scavenging hydrated electron in N₂O saturated solutions*. J Phys Chem, 1982. **86**: p. 2078-2084.
- 294. Fraenkel-Conrat, H., J.I. Harris, and A.L. Levy, *Methods of biochemical Analysis*, 1954. **Vol II**: p. 389.
- 295. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. J Mol Graph, 1990. **8**(1): p. 52-6, 29.

V Annexe

V.A Mise au point de l'analyse sur le séquenceur

Suite aux expériences de marquage au tritium, les peptides de synthèse ou de digestion sont déposés sur un séquenceur automatique de type Edman. Le protocole précédent utilisait alors une collecte manuelle, ainsi que les données du détecteur UV du séquenceur pour calculer les activités spécifiques des acides aminés. Ce sont principalement ces deux points qui ont été modifiés dans le but d'obtenir des résultats fiables et reproductibles.

Un collecteur de fraction automatique a été installé en sortie de séquenceur pour collecter les PTH-AA obtenus. De plus, nous avons choisi de réaliser une mesure UV des PTH-AA suite à la collecte. Nous avons fixé, comme limite de validité des données, une absorption minimale de 0,1. Pour cette valeur, la quantité de PTH-AA minimum à collecter est estimée à 500 pmoles (volume de mesure 80 μ L). Ainsi, trois points principaux ont dû être vérifiés:

- la quantité minimale de peptide à déposer sur le séquenceur pour obtenir au moins 500 pmoles pour le dernier résidu.
- le pourcentage de PTH-AA récupéré
- la vérification des AS mesurées avec un acide aminé d'AS connue

Un peptide de neuf résidus, l'oxytocine (CY^{*}IQNCPLG) marqué radioactivement sur la tyrosine en position 2, d'activité spécifique connue (AS = 1162 Bq.nmol⁻¹), a été utilisé pour quantifier les PTH-AA collectés et vérifier l'activité spécifique mesurée de la Tyr2.

• Quantité de PTH-AA récupérée lors du séquençage

Différentes quantités d'oxytocine de 1 à 5 nmoles sont séquencées sur 9 cycles. Les quantités de PTH-AA récupérées sont représentées sur la Figure V-1. A partir des dépôts de 1, 2 ou 5 nmoles, les 500 pmoles requises sont respectivement obtenues jusqu'au cycle 6, 8 et 9. Ainsi, seul le dépôt de 5 nmoles permet une récupération suffisante jusqu'à la fin. Toutefois, les 8 premiers acides aminés sont analysables en UV en déposant 2 nmoles. Le rendement de collecte est d'environ 70% au minimum. L'analyse d'un peptide d'environ dix acides aminés requiert une quantité déposée supérieure 5 nmoles. D'expérience, afin d'analyser un peptide de 10 à 20 résidus, il est nécessaire de déposer sur le filtre du séquenceur entre 5 et 10 nmoles.

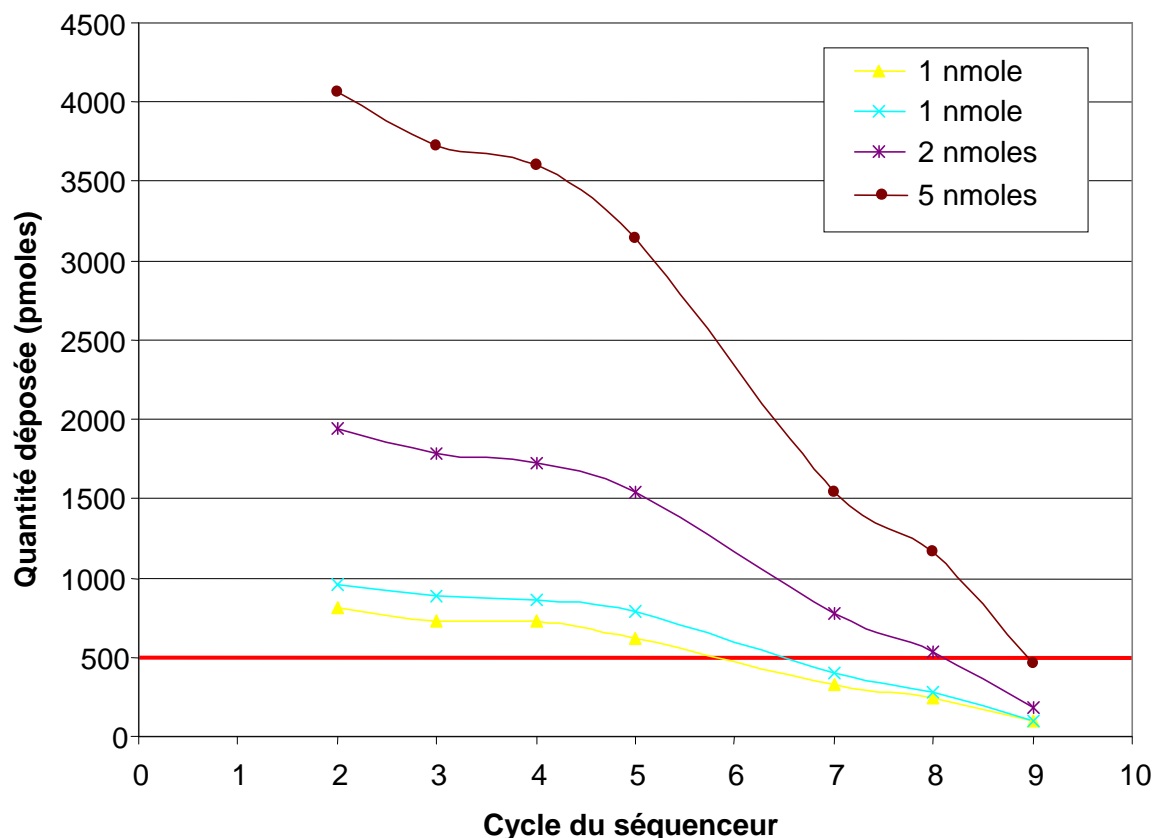


Figure V-1 Quantité d'oxytocine (CYIQNCPLG) séquencée en fonction du nombre de cycles. Lors de la réaction de coupure d'Edman, les cystéines sont dégradées. Toutefois, les cystéines peuvent être analysées si elles sont préalablement dérivées avec la vinylpyridine qui donne une cystéine pyridyl éthylée.

- **Remarque générale sur le séquençage et la collecte automatique**

Lors du séquençage dans le cycle C+1, environ 10 à 20 % de l'acide aminé précédant ressort (dû au fait que le rendement de clivage du cycle C n'est pas total) puis seulement 1 à 4% lors du cycle C+2. Ainsi, lorsqu'un peptide présente deux acides aminés identiques qui se suivent, le second va présenter 10 à 20 % de contamination dû au précédent.

Lors de la collecte automatique l'aiguille est rincée en début de cycle HPLC en collectant un blanc et intermédiairement quand le DPTU (issu de la réaction de dérivatisation de l'acide aminé) sort. Ces lavages permettent de rincer l'aiguille qui présente généralement 5% de radioactivité de l'acide aminé collecté précédemment. Cependant, deux acides aminés de deux cycles différents (C et C+1) sont parfois collectés sans qu'il y ait de lavage entre les deux. Ceci peut être gênant quand un acide aminé bien marqué du cycle précédent (C+1) sort sur le chromatogramme avant l'acide aminé du cycle en cours (C) peu marqué. Une contamination

est alors possible. Ce phénomène est relativement rare mais nécessite d'être vigilant lors de l'analyse des résultats.

- **Reproductibilité de l'activité spécifique**

Quatre nmoles d'oxytocine ($AS = 1162 \text{ Bq.nmol}^{-1}$) ont été séquencées 3 fois pour chaque collecte manuelle ou automatisée, en réalisant ensuite une quantification par lecture UV. Les résultats sont présentés dans la Figure V-2.

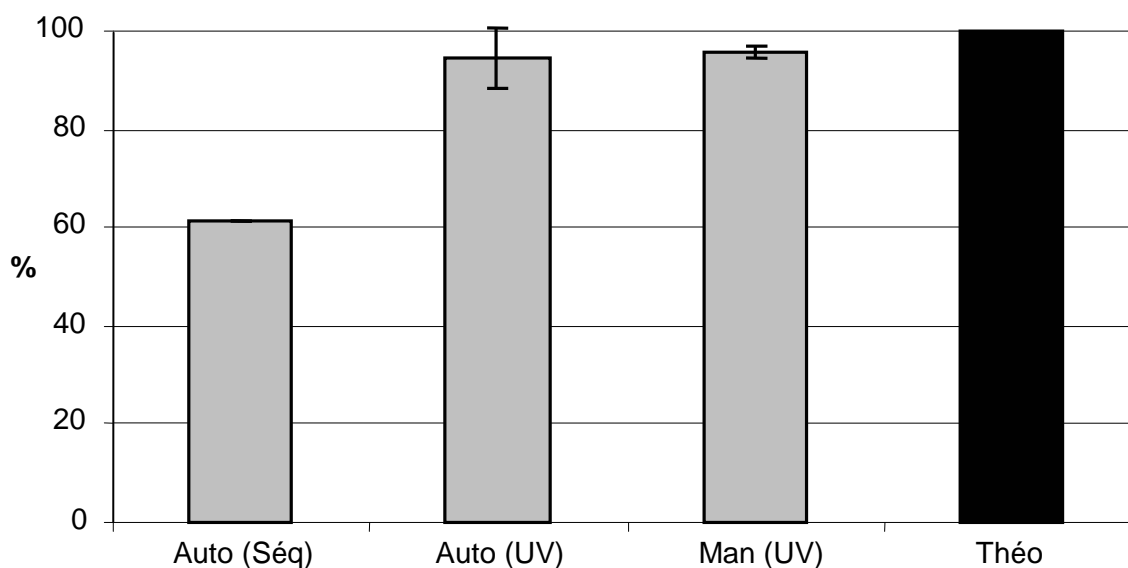


Figure V-2 Pourcentage de l'activité spécifique théorique obtenu par les différents protocoles de collecte et de lecture UV. Auto : collecte automatique des PTH-AA ; Man : collecte manuelle sur 1 min des PTH-AA ; (Séq) mesure de DO du détecteur UV du séquenceur ; (UV) : lecture UV manuelle ; Théo : pourcentage de l'activité spécifique attendue après analyse. Les écarts-types sont calculés sur 3 expériences.

Les deux types de collecte (collecte manuelle ou automatique) permettent d'estimer avec une grande précision (95%) l'activité spécifique théorique attendue. L'utilisation des données de DO du séquenceur sous-estime (62%) systématiquement l'activité spécifique réelle.

V.B Mise au point des conditions des expériences menées sur les peptides avec le LINAC.

La paragraphe suivant expose les paramètres de l'accélérateur linéaire d'électrons réglés pour produire les HO[•] nécessaires au marquage des peptides en minimisant la dégradation et en optimisant l'incorporation en atomes de tritium.

a. Minimisation de la dégradation

Dans le but d'estimer l'effet de différents paramètres (nombre d'impulsions, dose par impulsions, fréquence et présence d'agent de réparation ou non) sur la dégradation du peptide (Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly), deux phénomènes sont suivis par HPLC à 214 nm.

Le premier consiste à suivre l'apparition d'un pic sur le chromatogramme qui est sans doute une forme polymérique non caractérisée que nous supposons être un « dimère ». Plus le rapport Aire peptide / Aire du dimère est grand, moins il y a de dimérisation. Dans certains cas, c'est le pourcentage de dimère par rapport au peptide qui est calculé.

Le second phénomène utilisé est le suivi de la dégradation du peptide lors de l'irradiation avec le LINAC. Un pourcentage est calculé à partir de la quantité de peptide récupéré après irradiation par rapport à la quantité de départ avant irradiation. Plus ce pourcentage est petit, plus le peptide a été dégradé.

Tous les essais sont réalisés avec 100 µM de peptide et 187 µM de ³H-BPASS dans une solution dégazée avec N₂O à pH 7,2 dans du tampon phosphate 5 mM.

• Effet du nombre d'impulsion

Les solutions de peptides sont irradiées avec des impulsions de 20 Gy à une fréquence de 0,4 Hz (Figure V-3). Aucune dégradation n'apparaît à 10 impulsions. La quantité de dimère retrouvée reste négligeable (35 fois moins que le peptide soit 2,8 %). En augmentant le nombre d'impulsions, la récupération de peptide diminue rapidement avec seulement 60 % environ à 30 impulsions. La dégradation est bien avancée à 100 impulsions pour être quasi totale à plus de 200 impulsions. L'augmentation de la quantité de dimère est négligeable jusqu'à 50 impulsions où l'on retrouve 20 fois plus de peptide que de dimère (5 %). Puis la quantité de dimère augmente rapidement jusqu'à 10 fois plus de dimère à 456 impulsions.

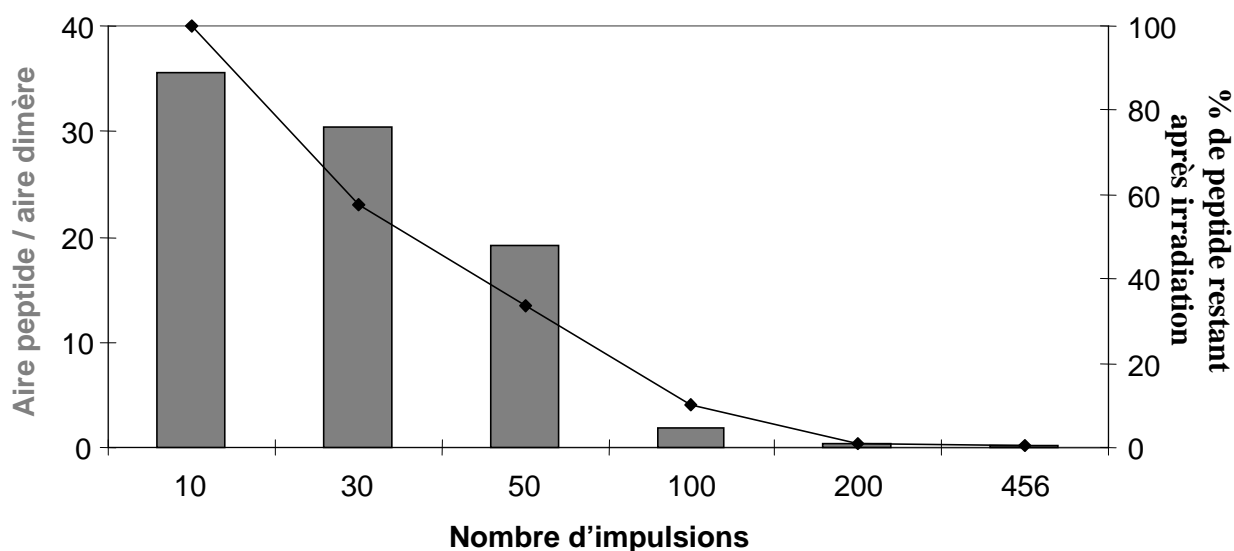


Figure V-3 Effet du nombre d'impulsions (20 Gy, 0,4 Hz) sur la dégradation d'un peptide. (Histogramme : Aire peptide / Aire dimère ; courbe : % de peptide restant après irradiation)

Ces résultats indiquent que suffisamment de ce peptide non dégradé est récupéré entre environ 1 et 6 équivalents d' HO^\bullet soit entre 10 et 50 impulsions de 20 Gy.

- **Effet de la dose par impulsions**

Pour une dose finale de 1000 Gy, trois échantillons sont bombardés avec des doses de 1, 10 ou 20 Gy toutes les 0,4Hz. La Figure V-4 indique que le peptide est moins dégradé ou se dimérise moins avec moins d'impulsions de plus fortes doses (50*20 Gy) qu'avec plus d'impulsions de plus faibles doses (1000*1 Gy).

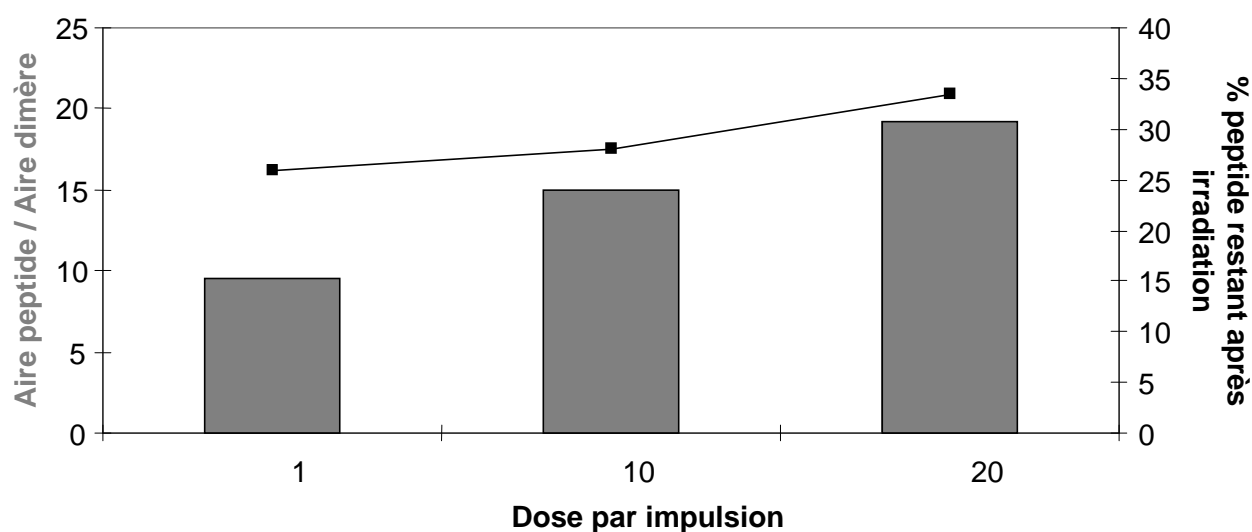


Figure V-4 Effet de la dose par impulsion (dose totale de 1000 Gy ; 0,4 Hz) sur la dégradation d'un peptide. (Histogramme : Aire peptide / Aire dimère ; courbe : % de peptide restant après irradiation).

Ce phénomène peut sans doute s'expliquer par les différences de temps d'exposition des échantillons qui varient de 2 à 42 min. Des concentrations instantanées plus faibles d' HO^\bullet ayant sans doute tendance à réagir plus efficacement sur le peptide, sur un temps s'approchant de l'heure, induisent plus de dégradation au final.

La dose de 20 Gy par impulsion est sélectionnée pour les futures expériences.

- **Effet de la fréquence de tir**

Quatre échantillons sont soumis au bombardement avec un total de 1000 Gy (50×20 Gy) avec des fréquences de tirs variables (Figure V-5).

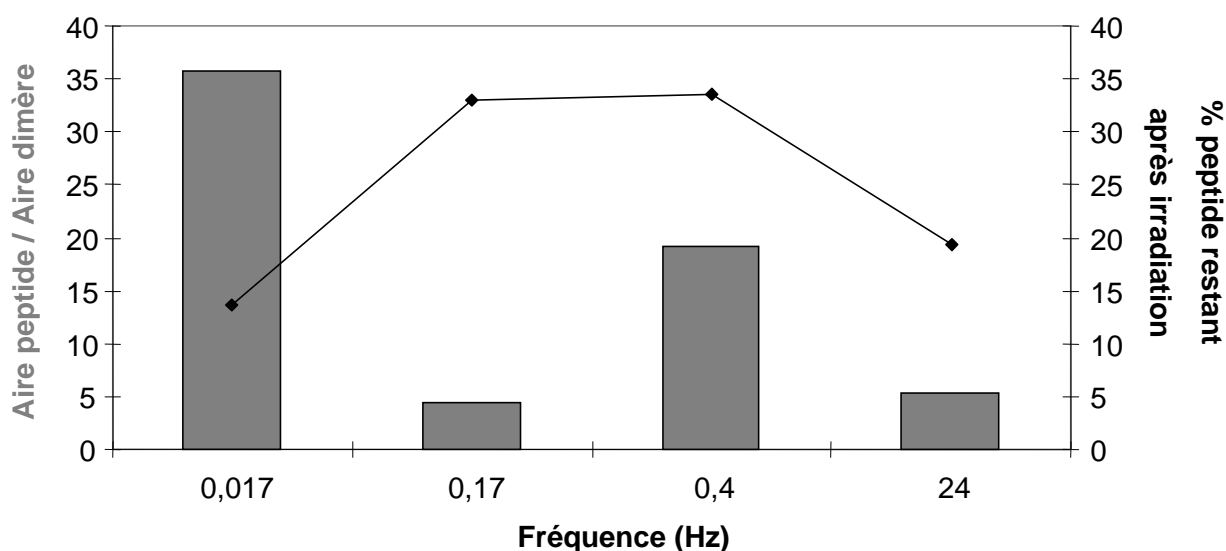


Figure V-5 Effet de la fréquence sur la dégradation d'un peptide (50 impulsions ; 20 Gy/impulsion). (Histogramme : Aire peptide / Aire dimère ; courbe : % de peptide restant après irradiation).

L'échantillon bombardé 1 fois par minute (0,017 Hz) est celui qui présente le moins de dimère (2,8%) mais le plus de dégradation (86 % de peptide détruit). De nouveau, le bombardement d'électrons pendant presque 1 heure, même espacé d'une minute entre chaque tir, a tendance à être plus dégradant pour le peptide qu'une dose soutenue pendant un temps plus court. Cependant, une dose totale de 1000 Gy dispensée en 2 secondes à 24 Hz a tendance à détruire l'échantillon (80 % de perte) et à former beaucoup de forme dimérique. Bien que le phénomène de recombinaison entre HO^\bullet est sans doute accentué, nous supposons que les concentrations instantanées en HO^\bullet sont telles que la réparation par $^3\text{H-BPASS}$ devient insuffisante. Les échantillons (0,17 et 0,40 Hz) sont ceux qui permettent de récupérer

le plus de peptide (environ 35 %) à 1000 Gy. Cependant, l'échantillon bombardé tous les 0,4 Hz est celui qui présente le moins de dimère et présente une fréquence qui est automatisable et donc reproductible. En effet, à une fréquence plus faible, le LINAC doit être utilisé manuellement pour obtenir des impulsions les plus régulières possibles.

La fréquence de 0,4 Hz est choisie pour la suite des expériences.

- **Effet de l'agent de réparation $^1\text{H-BPASS}$**

Deux échantillons avec ou sans agent de réparation $^1\text{H-BPASS}$ (1,8 éq.) sont bombardés avec 50 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz (5,8 éq. en HO^\bullet). La figure ci-dessous montre clairement l'effet de protection de l'agent avec 20 % de peptide en plus récupéré en sa présence. De plus, lors de la présence de $^1\text{H-BPASS}$, 30 fois plus de peptide sont observées par rapport à son dimère, contre seulement 5 fois plus en l'absence de l'agent phosphoré.

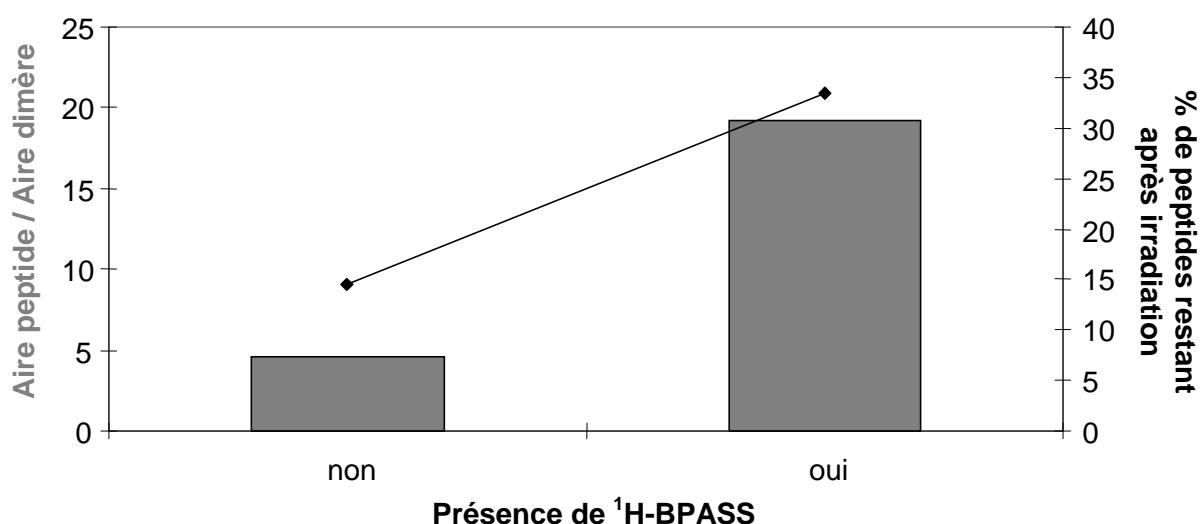


Figure V-6 Effet de la présence ou non de l'agent de réparation sur la protection du peptide (50 impulsions ; 20 Gy/impulsion ; 0,4Hz)

La présence du $^1\text{H-BPASS}$ induit deux phénomènes. Tout d'abord, il peut sans doute agir comme protecteur des peptides en étant lui-même attaqué par les radicaux hydroxyle. Le second rôle de $^1\text{H-BPASS}$ est de venir échanger son hydrogène (ou son tritium) en lieu et place de l'hydrogène arraché par les HO^\bullet sur les chaînes latérales des acides aminés et donc de réparer le peptide. Ces deux rôles peuvent sans doute expliquer la récupération plus importante de peptide en présence de l'agent de réparation.

Ce travail nous a permis d'entrevoir l'effet sur ce peptide d'une durée d'exposition trop longue. En effet, pour une période d'irradiation discontinue même à plus faibles doses, le peptide se dégrade plus qu'à de plus fortes doses sur un temps plus court (minutes). Cette observation indique que l'utilisation de l'autoradiolyse de l'eau tritiée qui génère les HO[•] en plusieurs heures, n'est pas bien adapté pour l'étude des protéines dans le cadre de cartographies de surfaces ou d'études des interactions protéine-protéine. En effet, il y a un risque que les dimérisations ou les diverses dégradations en surface déstructurent les protéines étudiées.

En conclusion, les conditions utilisées pour minimiser les dégradations et surtout récupérer suffisamment de peptide non dégradés sont les suivantes : entre 10 et 50 impulsions à 20 Gy à une fréquence de 0,4 Hz pour une solution de peptide de 100 µM avec 1 à 3 équivalents d'agent de réparation dans du tampon phosphate 5 mM pH 7,2.

b. Incorporation de tritium

Les facteurs influençant l'incorporation de tritium ont ensuite été étudiés. Ainsi, un mélange équivalent de trois peptides de 200 µM (Kemptide, valorphine et RIP), en présence de 2,15 équivalents (148 MBq) ou 4,3 équivalents (296 MBq) d'agent ³H-BPASS, est soumis au faisceau d'électrons accélérés. Différents paramètres (dose, nombre d'impulsions, nombre d'équivalents en agent tritié) sont testés afin de voir leur influence sur l'incorporation de tritium.

• Dose par impulsion

Pour une dose constante de 500 Gy, l'incorporation de tritium est supérieure quand la dose par impulsion est plus grande. Ceci concorde avec les résultats montrant une dégradation moins importante avec des doses par impulsion plus fortes sur un temps plus court (« effets de la dose », cf p197) Cette dose de 20 Gy par impulsion a donc le double avantage de récupérer plus de peptide et de mieux les marquer.

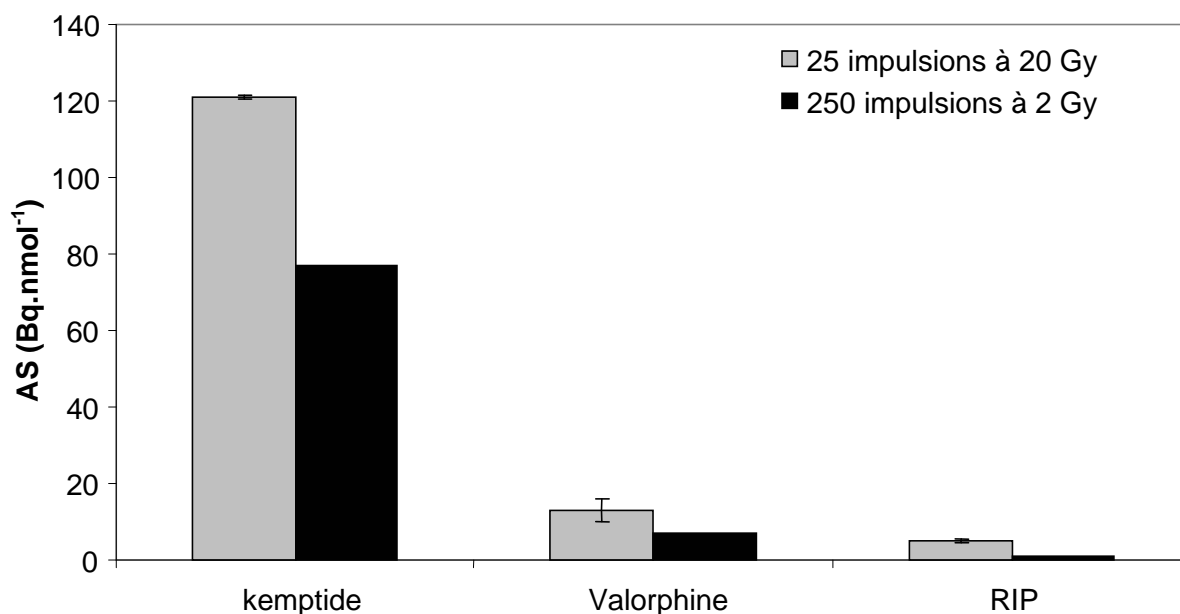


Figure V-7 Effet de la dose par impulsion sur l'incorporation en tritium

Une plus forte dose induit une plus grande concentration instantanée en HO^\bullet disponible pour marquer les peptides efficacement. La probabilité de rencontre d'un peptide avec un HO^\bullet est plus grande dans ce cas, ce qui peut favoriser ensuite une meilleure incorporation de tritium.

- **Effet du nombre d'impulsions et d'équivalents en ^3H -BPASS.**

Pour les trois peptides, à dose équivalente, l'augmentation de la quantité d' ^3H -BPASS (de 2,1 éq. à 4,3 éq.) n'influence pas sur l'incorporation de tritium dans les peptides. Dans ces conditions, l'agent tritié ne semble pas être un facteur limitant. Pour sa part, le doublement de la quantité de radicaux hydroxyle permet d'augmenter de 3 à 4 fois l'incorporation de tritium dans les trois peptides étudiés. Par la suite, ce paramètre peut donc s'avérer important pour optimiser le marquage.

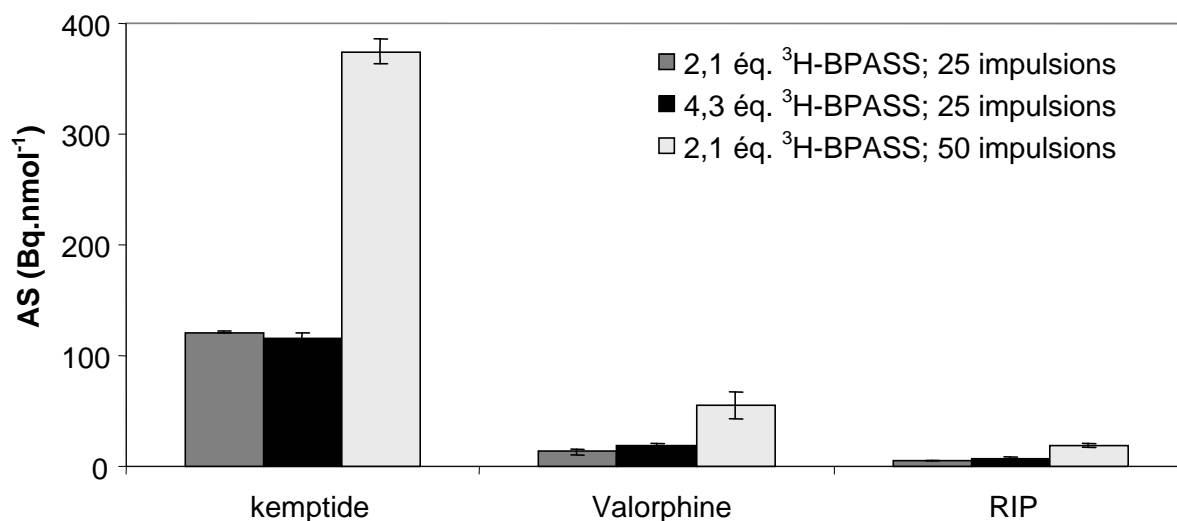


Figure V-8 Effet du nombre d'impulsion et d'équivalence en agent tritié.

- Effet de la concentration en peptide et de ³H-BPASS

Tout comme la Figure V-8, le vecteur n'est pas en quantité limitante. En effet, l'ajout d'³H-BPASS supplémentaire n'augmente pas l'incorporation de tritium. De plus, aucun changement significatif n'intervient lorsque que la quantité de protéine et d'HO[•] est diminuée de moitié en gardant la même quantité de ³H-BPASS (148 MBq).

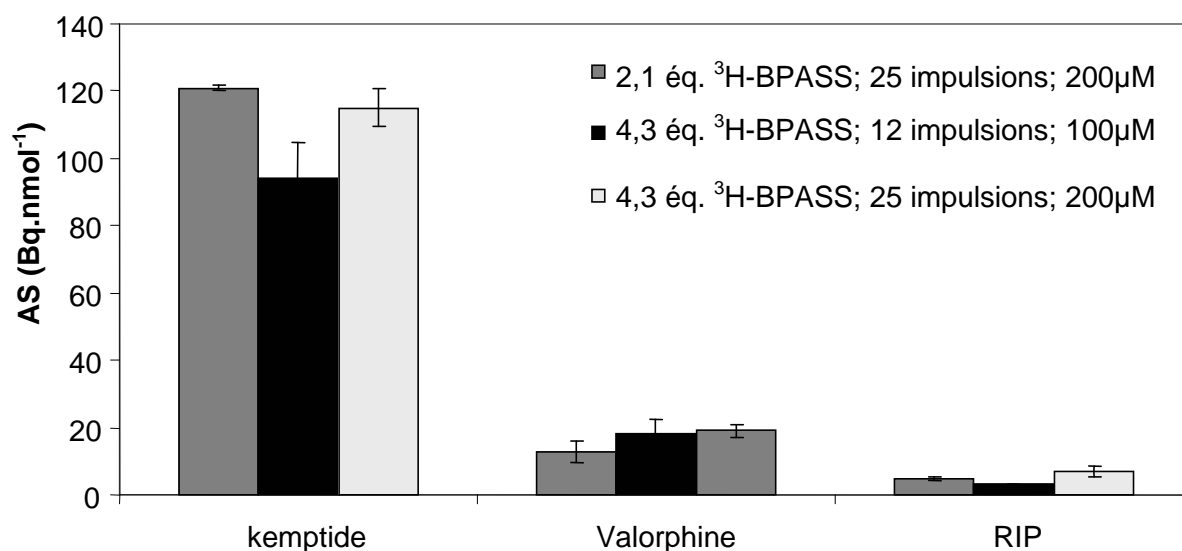


Figure V-9 Effet de la concentration en peptide et de ³H-BPASS sur l'incorporation de tritium

L'agent de réparation n'est pas un paramètre qui fait changer de façon significative l'incorporation de tritium dans les conditions testées. De plus, cette expérience montre que

l'on obtient des résultats similaires que l'on travaille à 100 ou 200 μM de peptides en ajoutant de façon proportionnelle les autres réactifs du système.

En conclusion de cette mise au point des conditions de bombardement électronique, les conditions standards sont : l'utilisation de 10 à 50 impulsions de 20 Gy à une fréquence de 0,4 Hz pour une solution d'environ 100 μM en peptides présentant environ 1 à 2 équivalents de ^3H -BPASS. Le principal facteur permettant d'augmenter l'incorporation de tritium est le nombre d'impulsions et sera utilisé en conséquence.

c. Exemple de détection de radicaux sur un peptide avec le LINAC

Le peptide Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly est bombardé en mélange dans des conditions similaires à celles utilisées lors de l'expérience du paragraphe II.F. La seule différence notable est le moyen de production d' HO^\bullet , soit par bombardement électronique (50*20 Gy à 0,4 Hz soit 1000 Gy) soit par autoradiolyse de l'eau tritiée (8h pour 1670 Gy). En se servant du fait que ce peptide présente une linéarité de marquage (Figure II.18), les activités spécifiques des acides aminés ont été normalisées pour une dose de 1000 Gy. Une comparaison des résultats obtenus avec les deux sources différentes de production de HO^\bullet est représentée sur la figure II.28.

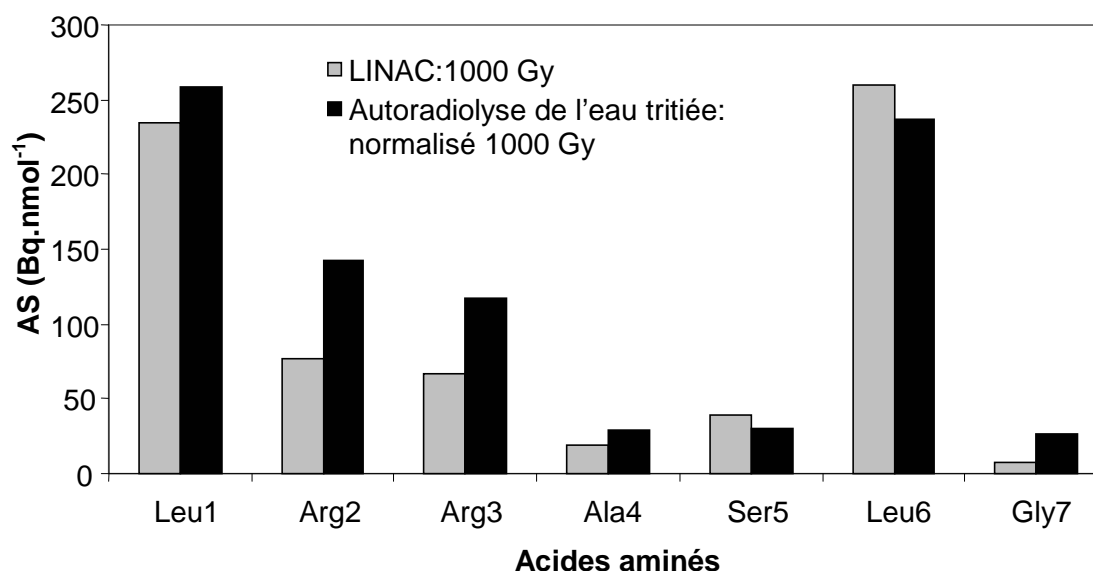


Figure V-10 Comparaison des activités spécifiques obtenues après bombardement électronique ou autoradiolyse de l'eau tritiée.

De manière générale, la tendance d'incorporation de tritium est respectée dans les deux cas. Seuls les résultats obtenus avec l'arginine sont un peu différents.

V.C Etude des peptides en mélange après autoradiolyse de l'eau tritiée

Cette figure est citée dans le paragraphe II.F.1.

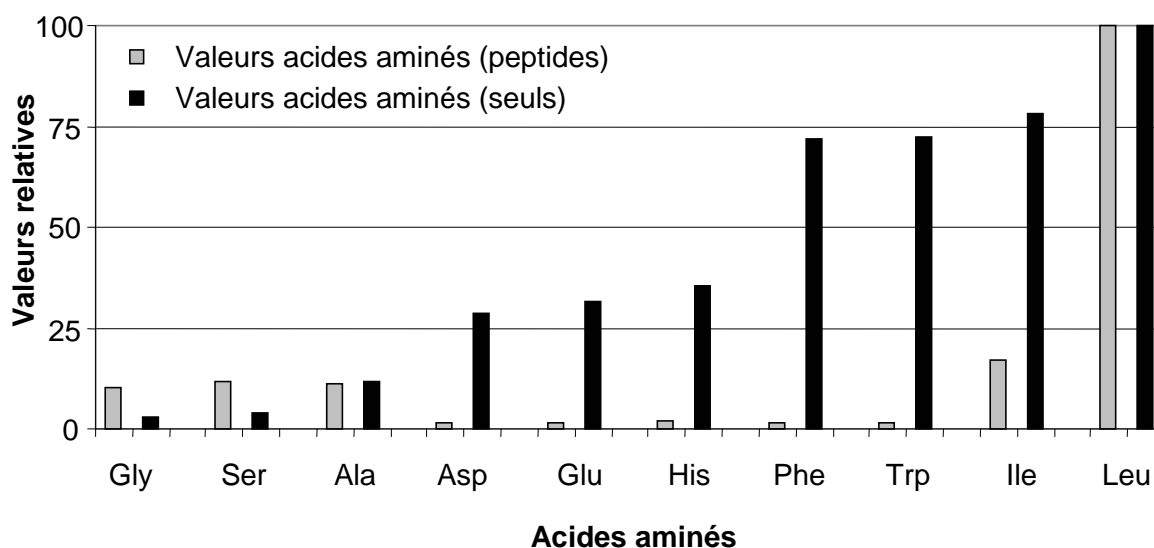


Figure V-11 Activités spécifiques des acides aminés issus des peptides en mélange normalisées sur l'activité spécifique de la leucine la plus marquée, comparées à celles des acides aminés isolés.

V.D Interaction H3₁₂₂₋₁₃₅ avec hAsf1₁₋₁₅₆

La méthode a été appliquée dans des conditions identiques aux échantillons contenant le peptide H3₁₂₂₋₁₂₅ seul ou en présence soit de hAsf1₁₋₁₅₆ soit de l'apomyoglobine (Matériels et Méthodes). Après purification de H3₁₂₂₋₁₃₅, le peptide a été séquencé et l'activité spécifique pour chacun des acides aminés calculée en normalisant sur le résidu M₃ TAG.

La Figure V-12 montre les activités spécifiques brutes du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ obtenues en présence de l'apomyoglobine ou en interaction avec hAsf1₁₋₁₅₆. Même en absence de normalisation sur M₃ TAG, les résultats sont facilement comparables et analysables.

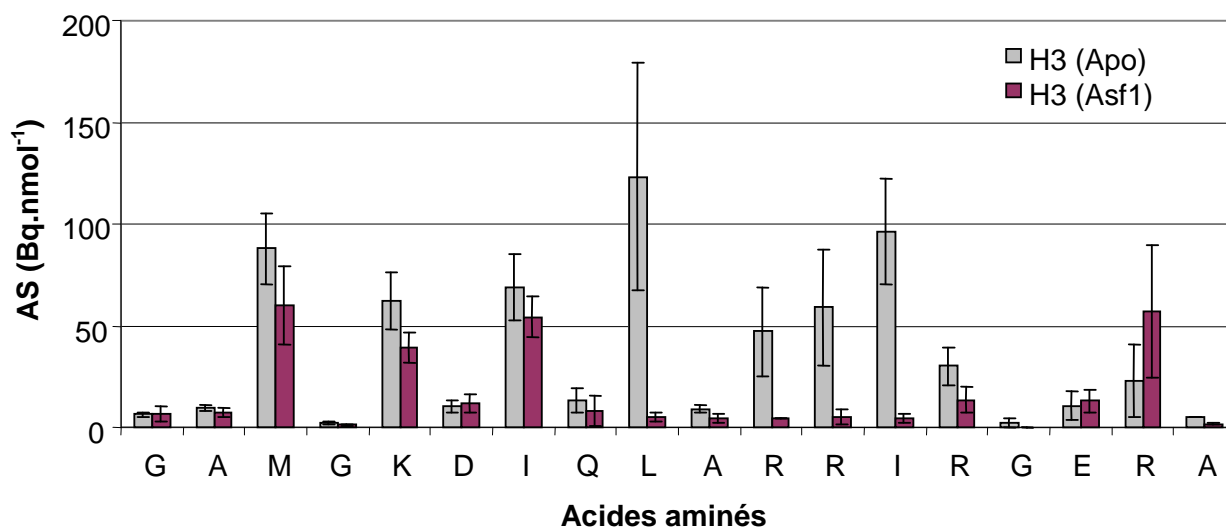


Figure V-12 Activités spécifiques brutes des résidus de GAMG-H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μ M) en présence d'apomyoglobine (APO) (280 μ M) ou de hAsf1₁₋₁₅₆ (280 μ M) (100 impulsions à 20 Gy 0,4 Hz ; 1 $\text{eq. } ^3\text{H-BPASS}$ (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée en N₂O). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais.

La Figure V-13 montre les activités spécifiques obtenues pour H3₁₂₂₋₁₃₅ seul ou en présence de l'apomyoglobine. Aucune différence notable n'est observée après normalisation entre ces deux échantillons à l'exception du résidu R₁₃₁. Toutefois, une seule valeur a été obtenue pour ce résidu dans l'échantillon du peptide seul. Cette valeur n'est sans doute pas significative.

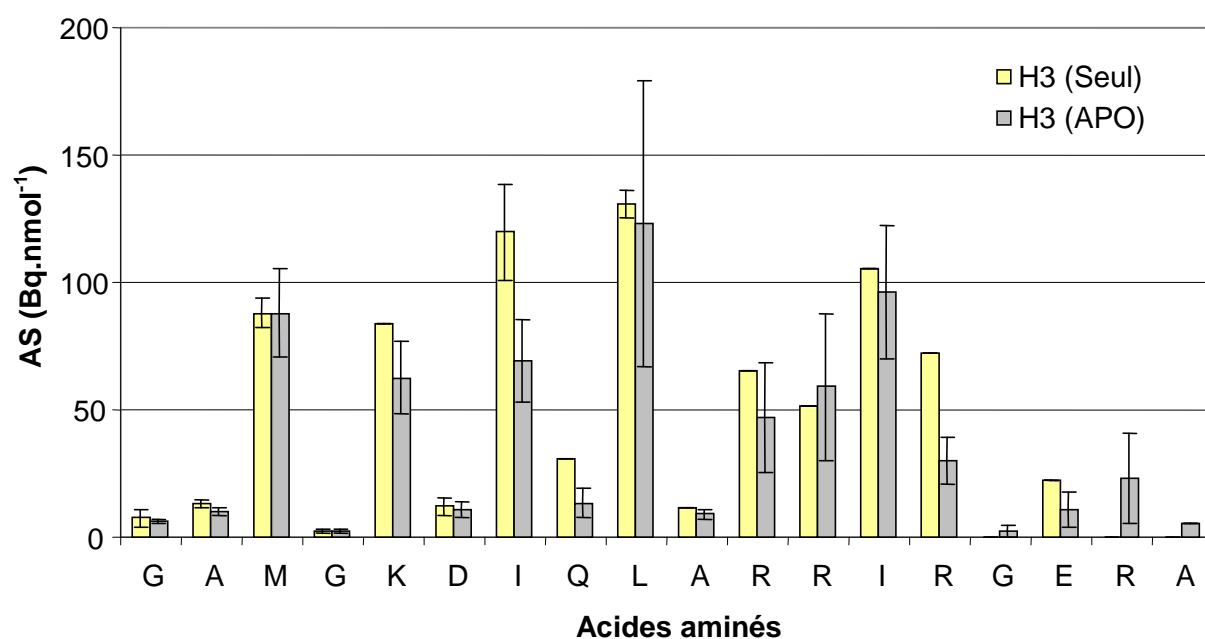


Figure V-13 Activités spécifiques normalisées sur M_3 TAG des résidus de GAMG-H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μ M) en présence ou non d'apomyoglobine (APO) (280 μ M) (100 impulsions à 20 Gy 0,4 Hz ; 1 éq. ^3H -BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée en N₂O). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais pour l'échantillon avec Apo, et de 2 essais pour le peptide seul (Les valeurs manquantes sont dues à des problèmes de quantité de peptides récupérés).

L'histogramme suivant représente les résultats des activités spécifiques de H3₁₂₂₋₁₂₅ obtenues lors des expériences avec le peptide seul ou en présence de l'apomyoglobine ou de hAsf1₁₋₁₅₆.

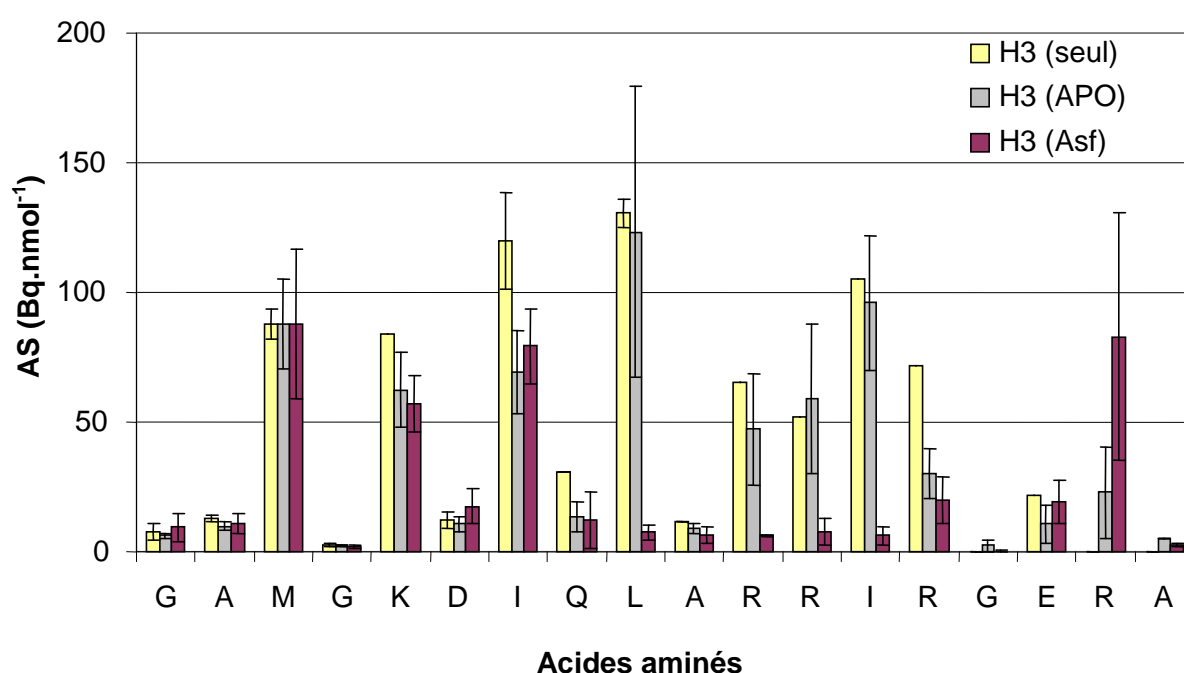


Figure V-14 Activités spécifiques normalisées sur M_3 TAG des résidus de GAMG-H3₁₂₂₋₁₃₅ (140 μ M) seules, ou en présence soit d'apomyoglobine (APO) (280 μ M) soit d'hAsf1₁₋₁₅₆ (280 μ M) (100 impulsions à 20 Gy 0,4 Hz ; 1 éq. ^3H -BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée N₂O). Les valeurs obtenues sont des moyennes de 3 essais, sauf pour H3₁₂₂₋₁₃₅ seul (2 essais et des valeurs manquantes).

Les valeurs brutes des essais menés avec le LINAC sont représentées dans les deux histogrammes et le tableau suivants :

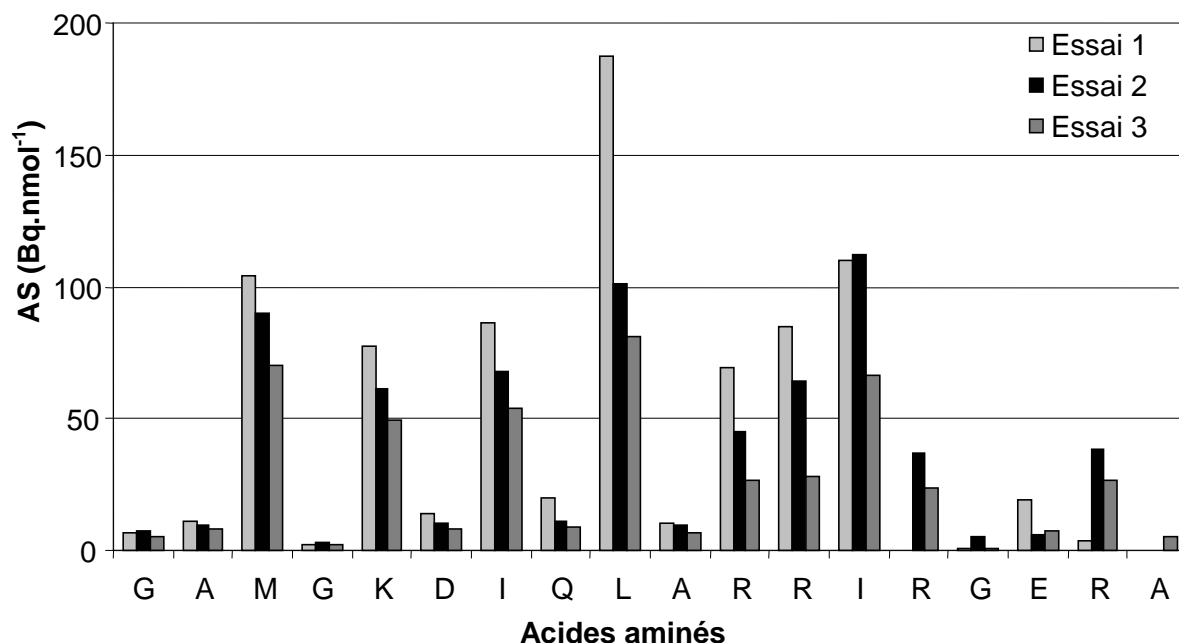


Figure V-15 Valeurs brutes des activités spécifiques (Bq.nmol⁻¹) des résidus de H3₁₂₂₋₁₂₅ (140 μM) issus des 3 essais contenant l'apomyoglobine (280 μM) lors de l'expérience LINAC à 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz (1 éq. ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée N₂O).

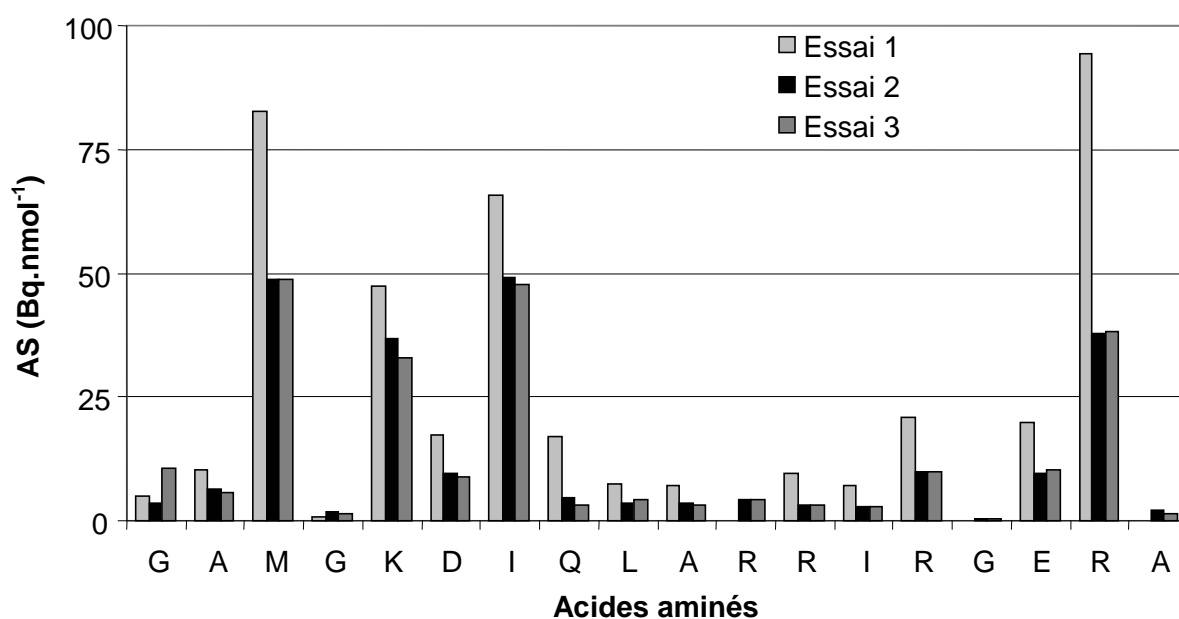


Figure V-16 Valeurs brutes des activités spécifiques (Bq.nmol⁻¹) des résidus de H3₁₂₂₋₁₂₅ (140 μM) issus des 3 essais contenant hAsf1₁₋₁₅₆ (280 μM) lors de l'expérience LINAC à 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz (1 éq. ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée N₂O).

AA	AS (Bq.nmol ⁻¹)	
	Essai 1	Essai 2
G	44	22,7
A	61	52,3
M	500	402,1
G	13	9,1
K122	367	ND
D123	63	42,7
I124	583	466,3
Q125	135	ND
L126	589	554,9
A127	51	ND
R128	285	ND
R129	226	ND
I130	460	ND
R131	316	ND
G132	ND	ND
E133	97	ND
R134	ND	ND
A135	ND	ND

Tableau V-1 Valeurs brutes des activités spécifiques (Bq.nmol⁻¹) des résidus de H3₁₂₂₋₁₂₅ (140 µM) issus des 2 essais avec le peptide seul, lors de l'expérience LINAC à 100 impulsions de 20 Gy à 0,4 Hz (1 éq. ³H-BPASS (AS = 514 GBq.mmol⁻¹) ; 4°C ; Tampon phosphate 10 mM pH 7,8 ; saturée N₂O).

V.D.1 Interaction hAsf1₁₋₁₅₆ avec H3₁₂₂₋₁₃₅

a. Comparaison de marquage entre 50 et 200 impulsions

Les expériences ont été faites à l'identique à l'exception de la qualité de ³H-BPASS avec une AS = 536 GBq.mmol⁻¹ ou AS = 629 GBq.mmol⁻¹ pour l'échantillon à 50 impulsions et 200 impulsions respectivement (Figure V-17 ; Figure V-18).

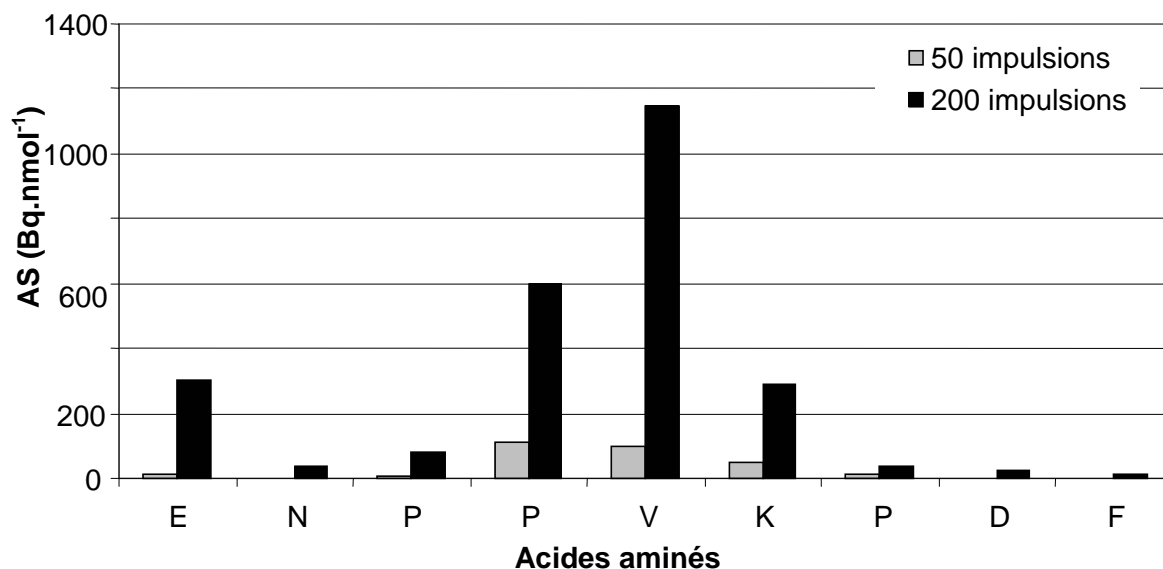


Figure V-17 Activités spécifiques des résidus du peptide $^{124}\text{-ENPPVKPDFSK-}^{134}$ issu de la digestion trypsique de hAsf1₁₋₁₅₆ soumise à 50 ou 200 impulsions.

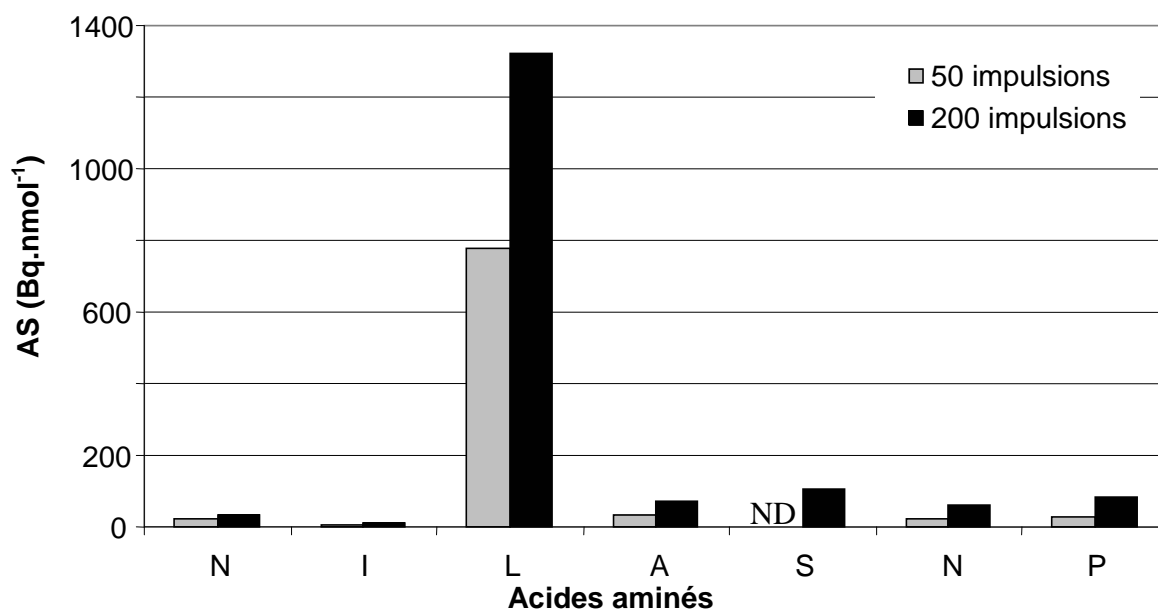


Figure V-18 Activités spécifiques des résidus du peptide $^{138}\text{-NILASNPR-}^{145}$ issu de la digestion trypsique de hAsf1₁₋₁₅₆ soumise à 50 ou 200 impulsions.

b. Résultats normalisés de $^{124}\text{-ENPPVKPDFSK-}^{134}$ issu de hAsf1₁₋₁₅₆ à 50 impulsions

Les résultats suivant ont été normalisés avec une valeur moyenne des rapports entre AS libre / AS lié de P₁₂₇, V₁₂₈ et K₁₂₉. Le facteur correctif est très proche de 1 et donc modifie très peu les activités spécifiques brutes obtenues.

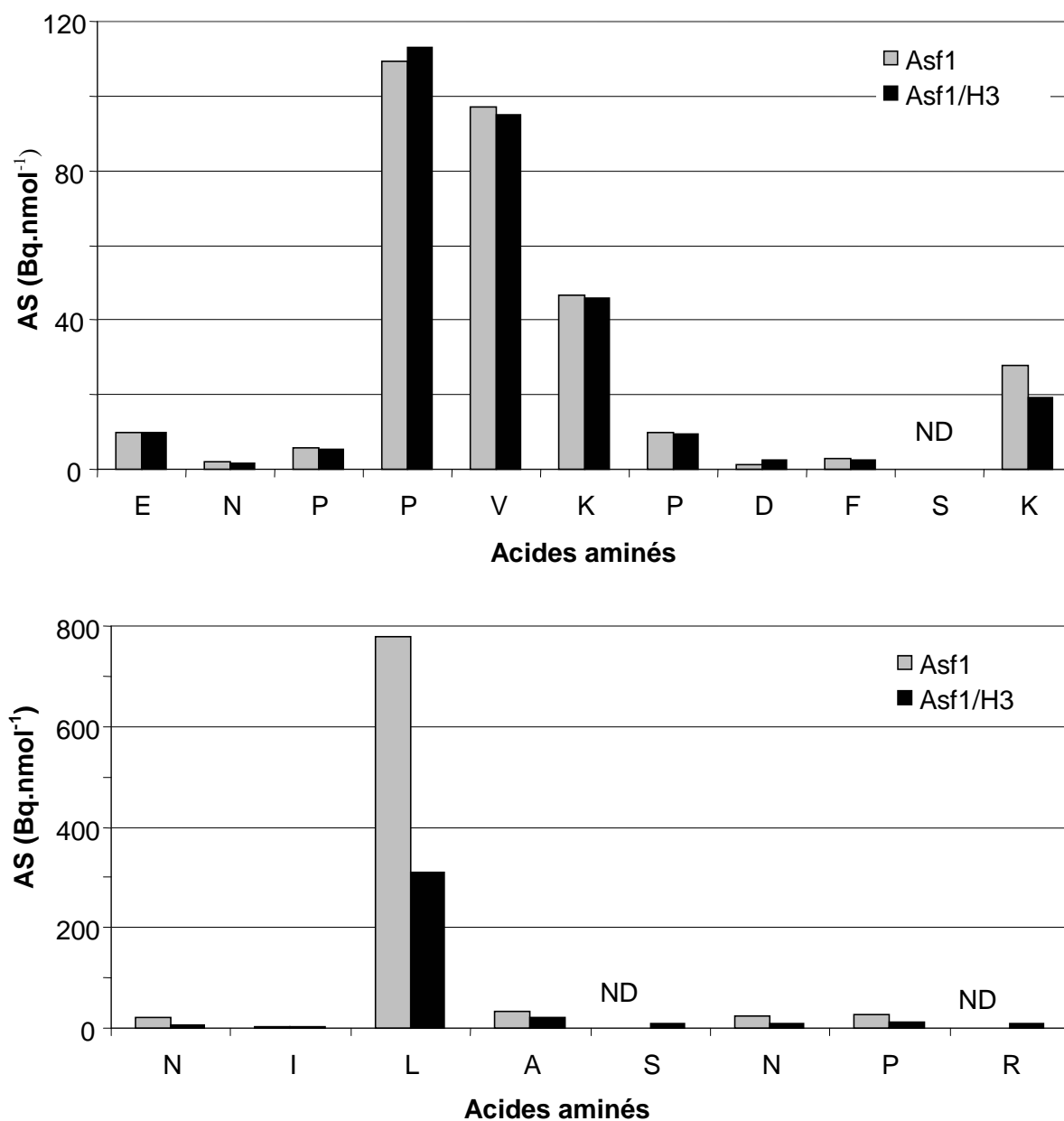


Figure V-19 Activités spécifiques normalisées (facteur * 1,005) des résidus du peptide ¹²⁴-ENPPVKPDFSK-¹³⁴ et de ¹³⁸-NILASNPR-¹⁴⁵ issus de la digestion trypsique de hAsf1₁₋₁₅₆ soumise à 50 impulsions en présence ou en l'absence de H3₁₂₂₋₁₃₅.

c. Calcul d'accessibilité : le logiciel WHAT TF

La surface d'accessibilité moléculaire est calculée par le logiciel WHAT IF selon la surface de Connolly. Cette surface est exprimée en Å². WHAT IF utilise les rayons de Van der Waals: C : 1,8 Å; O : 1,4 Å; N : 1,7 Å; S : 2,0 Å.

Les calculs de la surface d'accessibilité moléculaire pour chaque résidu sont effectués en mimant la taille de l'agent de réparation en prenant une sphère de 3,5 Å (Figure V-20).

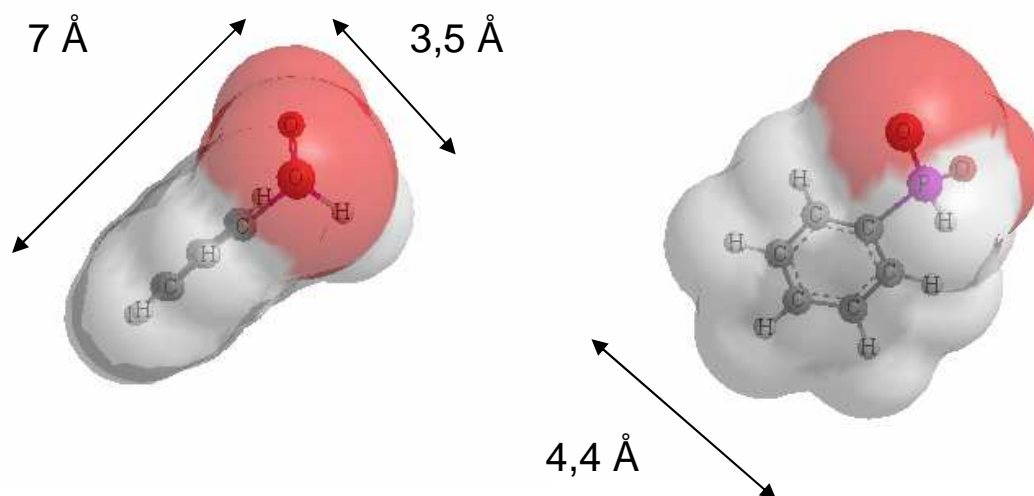


Figure V-20 Vue de coté ou de face de la structure de $^3\text{H-BPASS}$ avec en transparence la surface d'accessibilité au solvant (Logiciel Chem3DUltra). Atomes de carbone (gris foncé) ; atomes d'hydrogène (gris clair) ; atomes d'oxygène (rouge) ; atome de phosphore (rose).

Le logiciel est disponible sur le site : <http://swift.cmbi.kun.nl/whatif/> et est publié dans l'article de G. Vriend [295].

Les résultats d'accessibilité de la protéine seule ont été obtenus en utilisant les structures pdb 1TEY de hAsf1₁₋₁₅₆ seule ou 2IIJ du complexe hAsf1₁₋₁₅₆-H3₁₂₂₋₁₃₅ en enlevant les données de H3₁₂₂₋₁₃₅ [286, 287]. Aucune différence notable d'accessibilité pour ces deux structures n'a été observée indiquant très peu de changement de conformation de la structure de hAsf1₁₋₁₅₆ lors de l'interaction. Les calculs d'accessibilité pour la protéine en complexe ont été fait à partir de la structure pdb 2IIJ [287]. Les valeurs d'accessibilité de H3₁₂₂₋₁₃₅ déplié sont données par la valeur Vac du logiciel WHAT IF.

Les résultats d'accessibilité des acides aminés du peptide H3₁₂₂₋₁₃₅ libre et déplié, ou en interaction et replié en hélice α , sont répertoriés dans le tableau suivant.

	Accessibilité de tous les atomes en Å ²		Accessibilité des liaisons (CH) en Å ²	
	Déplié	Lié	Déplié	Lié

G	30,3	25,4	9,3	6,9
A	23	7,4	17,5	0,2
M	41,5	33,5	20,2	15,2
G	15,4	1,9	8,8	1,7
K 122	37,6	18,5	20,5	0,6
D 123	26,3	15,9	6,2	2,5
I 124	36,3	15,2	34	15,2
Q 125	33,4	5	9,4	0
L 126	36,7	12,9	32,6	0,1
A 127	23,3	3,1	18,5	1,1
R 128	47,4	19,5	10,2	1
R 129	47	17,4	12,5	0
I 130	35,7	21,5	33,2	0
R 131	45,9	34,8	14,8	1,6
G 132	14,3	3,4	5,9	1,1
E 133	27,9	8,3	11,4	0
R 134	46,9	32,8	14,4	1,1
A 135	33,9	14,3	16,9	2,2

Tableau V-2 Accessibilités des résidus de H3₁₂₂₋₁₃₅ calculées avec le logiciel WHAT IF avec une sphère de rayon de 3.5 Å mimant ³H-BPASS (pdb 2IIJ). Les deux colonnes de gauche représentent l'accessibilité totale et les deux colonnes de droite l'accessibilité des CH. Le terme « Déplié » signifie que le peptide n'est pas replié en hélice α et en absence de hAsf1₁₋₁₅₆ ; le terme « lié » représente le peptide en hélice α en présence de la protéine hAsf1₁₋₁₅₆.

Les résultats d'accessibilité des acides aminés des trois peptides séquencés d'asf1₁₋₁₅₆ libre ou en interaction, sont répertoriés dans le tableau suivant.

	Accessibilité de tous les atomes (libre/en interaction) en Å ²	Accessibilité des liaisons (CH) (libre/en interaction) en Å ²
E124	17,5	0,5
N125	12,7	5,2
P126	7,2	6,6
P127	3,1	3,1

V128	21,3		21,3	
K129	20		15	
P130	0,2		0	
D131	4,8		0	
F132	2,9		2,9	
S133	7,8		5,1	
K134	10,6		2,7	
N138	2,3		0	
I139	0		0	
L140	3,3	3,1	3,3	3,1
A141	4,2		2,3	
S142	15,9		11,8	
N143	10,3		0	
P144	3,6		3,1	
R145	23,4	12	1,1	0
F149	7,6	4,1	7,6	4,1
H150	20,6		11,8	
I151	0,3		0,3	
N152	4,1		0,7	
W153	0,5		0,4	
E154	3,6		3,6	
D155	18,1		3,2	
N156	13,6		6,3	

Tableau V-3 Accessibilités calculées avec le logiciel WHAT IF pour les acides aminés ou pour les liaisons C–H des peptides ¹²⁴-ENPPVKPDFSK-¹³⁴, ¹³⁸-NILASNPR-¹⁴⁵ et ¹⁴⁹-FHINWEDN-¹⁵⁶. Seules les accessibilités qui ont varié en présence de H3₁₂₂₋₁₃₅ sont représentées, en plus de la valeur d’accessibilité libre.

V.E Dichroïsme circulaire de l'apomyoglobine après irradiation avec le LINAC

Nous avons donc suivi par dichroïsme circulaire les effets de l'irradiation sur la structure secondaire de l'apomyoglobine avec ou sans $^1\text{H-BPASS}$. Les conditions utilisées ici pour réaliser le dichroïsme circulaire de l'apomyoglobine dans différentes conditions sont en terme d'équivalence de protéine, de $^1\text{H-BPASS}$ et d' HO^\bullet équivalentes à celles utilisées lors de l'étude de surface par Olivier Thomas. Le spectre de dichroïsme circulaire de l'apomyoglobine est représenté sur la Figure V-21.

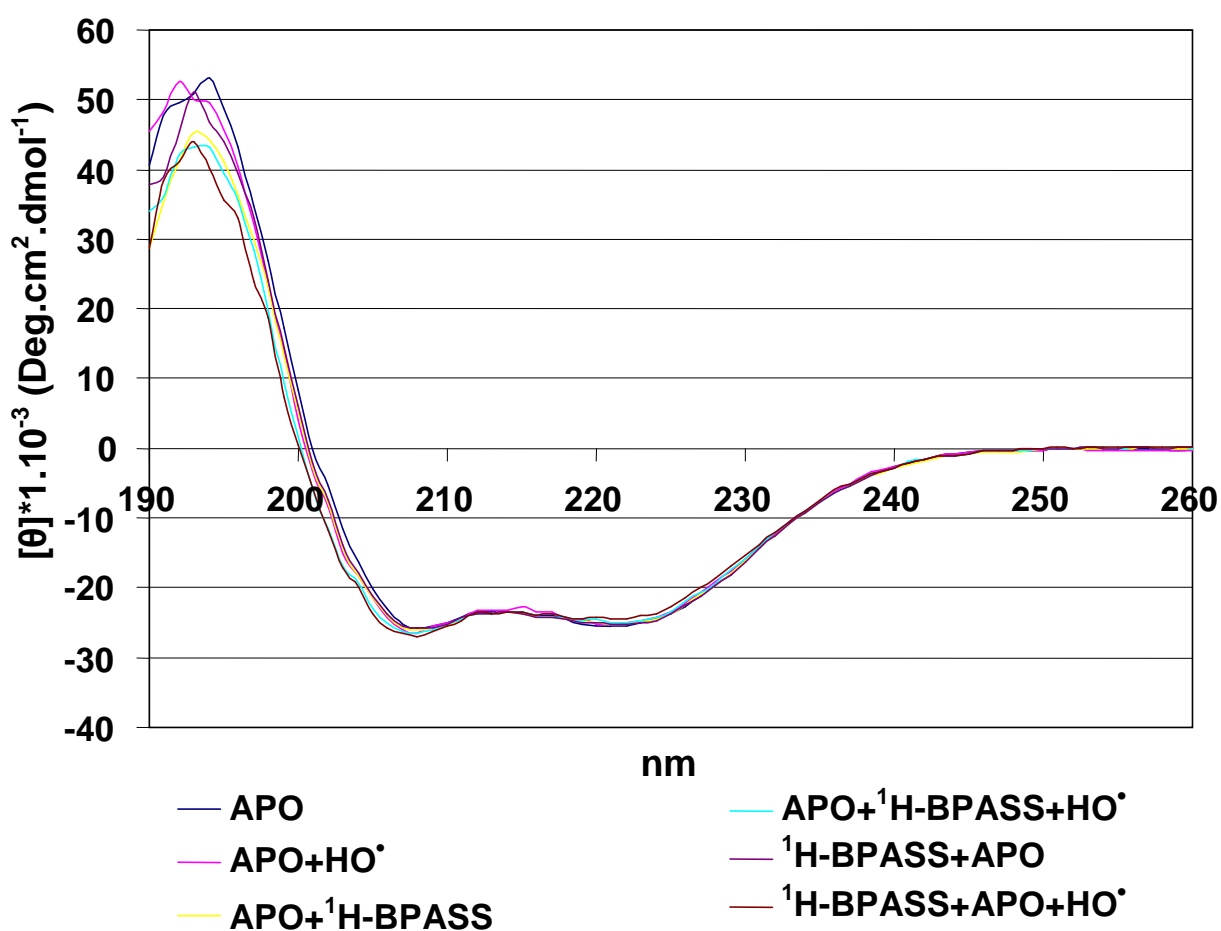


Figure V-21 Dichroïsme circulaire de l'apomyoglobine dans différentes conditions

Cette expérience a été très concluante. En effet, ni le vecteur seul, ni les HO^\bullet en présence ou non du $^1\text{H-BPASS}$, n'affectent la structure secondaire de l'apomyoglobine. Notre méthode respecte donc l'intégrité de la structure de cette protéine plutôt sensible et fragile.